



Synthese und Untersuchung  
photoaktivierbarer zyklischer  
Oligonukleotide und sterisch  
anspruchsvoller photolabiler  
Schutzgruppen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von

**Patrick Seyfried**

Frankfurt am Main, 2017

(D 30)







Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Leitung von Professor Doktor Alexander Heckel angefertigt und vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Erster Gutachter: Prof. Dr. Alexander Heckel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Datum der Disputation:









*„Dicebat Bernardus Carnotensis nos esse quasi nanos gigantum umeris insidentes, ut possimus plura eis et remotiora videre, non utique proprii visus acumine, aut eminentia corporis, sed quia in altum subvehimur et extollimur magnitudine gigantea“*

*„Wir sind gleichsam Zwerge, die auf den Schultern von Riesen sitzen, um mehr und Entfernteres als diese sehen zu können - freilich nicht dank eigener scharfer Sehkraft oder Körpergröße, sondern weil die Größe der Riesen uns zu Hilfe kommt und uns emporhebt.“*

*Bernhard von Chartres (zitiert durch Johannes von Salisbury)*

*Meinen Eltern*







## Zusammenfassung

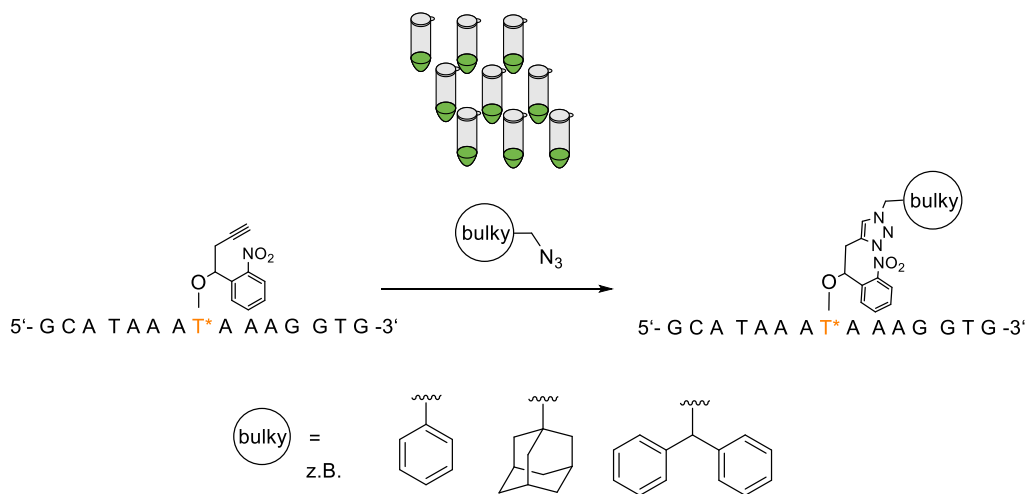
Photolabile Schutzgruppen haben sich im Laufe der letzten Jahre als wertvolle Werkzeuge für die Untersuchung und Regulation biologischer Prozesse etabliert. Dabei wird die photolabile Schutzgruppe auf geeignete Weise mit Biomolekülen verknüpft, sodass deren Funktion temporär deaktiviert wird. Durch Bestrahlen mit Licht geeigneter Wellenlängen wird die photolabile Schutzgruppe entfernt und die Aktivität des Biomoleküls bzw. des zu beobachtenden Prozesses wiederhergestellt. Die Grundlagen der Verwendung photolabiler Schutzgruppen im biologischen Kontext wurden in zwei Pionierarbeiten 1977 von J.W. ENGELS und 1978 von J.F. HOFFMAN gelegt. Davon ausgehend haben sich zahlreiche Anwendungen photolabiler Schutzgruppen für biologisch interessante Molekülklassen entwickelt. Auf dem speziellen Gebiet der Nucleinsäuren wurden in den letzten Jahren einige fundamentale Mechanismen entdeckt und aufgeklärt, die nicht zuletzt auch therapeutisch interessante Anwendungsmöglichkeiten für photolabile Schutzgruppen bieten. Hierbei stellt das An-/Aus-Schaltverhalten von Nucleinsäuren jedoch ein nicht-triviales Problem dar. Selbst der gezielte Einbau einer einzelnen photolabilen Schutzgruppe in ein multifunktionales Oligonucleotid führt in der Regel nämlich nicht zu einer vollständigen Deaktivierung desselben. Ein multipler Einbau photolabiler Schutzgruppen entlang der Sequenz eines funktionellen Oligonucleotids schaltet die Hintergrundaktivität im deaktivierten Zustand zwar vollständig aus, allerdings müssen in diesem Fall hohe Bestrahlungsintensitäten bzw. -dauern für das Entfernen aller photolabilen Modifikationen angewendet werden. Dadurch geht zum einen die Zeitauflösung der lichtgeschalteten Prozesse verloren, nicht zuletzt erhöht sich dabei aber auch das Risiko von lichtinduzierten Schäden am biologischen System. Das Kernthema der vorliegenden Dissertation war es daher, neue Architekturen für den Aufbau photoaktivierbarer Oligonucleotide zu entwickeln.

Das erste große Projekt basierte auf der Annahme, dass sich Duplexstrukturen, die für die Funktion vieler Nucleinsäuremechanismen fundamental sind, durch Zyklisierung von Oligonucleotiden global destabilisieren und damit effizienter photoaktivieren lassen, als durch lokalen Einbau einzelner photolabiler Schutzgruppen in Oligonucleotide. Hierzu wurden geeignete Alkin-Modifikationen an photolabile Nitrobenzyl- und Cumarin-Schutzgruppen angebracht und diese an die Nucleobasen verschiedener DNA-Bausteine geknüpft. Es ist daraufhin gelungen, Oligonucleotide mit je zwei photolabilen Alkin-Modifikationen herzustellen und diese intrasequentiell über eine Cu(I)-katalysierte Click-Reaktion mit einem Bisazid-Linker zu zyklisieren. Die so erhaltenen Oligonucleotide wiesen dramatisch erniedrigte Schmelzpunkte gegenüber den nativen Duplexen, sowie gegenüber den zweifach photolabil geschützten Oligonucleotiden auf. Dabei wurde außerdem festgestellt, dass Zyklisierungsparameter wie die Linkerlänge, -polarität und -flexibilität und die Wahl der photolabilen Schutzgruppe keinen signifikanten Einfluss auf die Duplexstabilität hat. Über



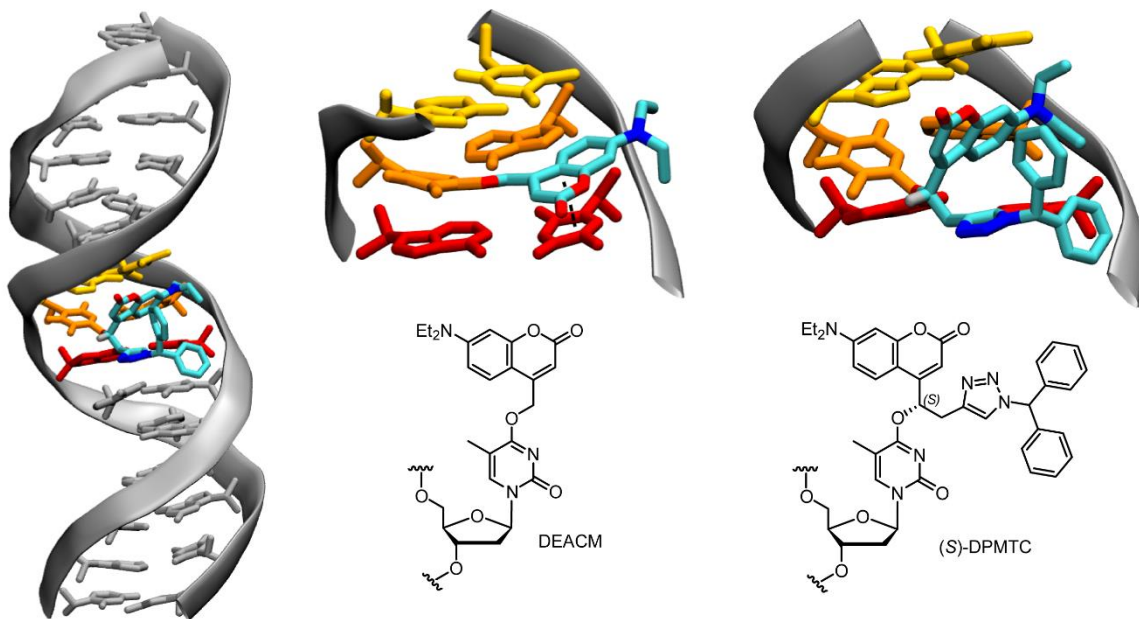
Phosphoramidite in kurzer Zeit hergestellt werden können. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Zyklisierung mittels Cu(I)-katalysierter Click-Reaktion auch entlang des Phosphatrückgrats funktioniert und zu destabilisierten Duplexstrukturen führt, wobei die Duplexdestabilisierung jedoch im Vergleich zur Zyklisierung entlang der Nucleobasen geringer ausfällt. Entgegen der anfänglichen Befürchtungen stellten sich die phosphatzyklisierten Oligonukleotide auch gegenüber Hydrolyse als stabil heraus. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt eine zyklisierte Variante eines Antisense-Oligonukleotids hergestellt, welches die apoptotisch wirkende miR-34a adressiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zyklisierungsstrategie grundsätzlich kompatibel mit komplizierteren Oligonukleotiden (2'-Methoxy-RNA und Phosphorthioat-Modifikationen) ist. Die fertigen Proben stehen nun für erste *in vivo* Experimente zur Verfügung.

Das dritte Projekt dieser Arbeit drehte sich um die Frage, inwieweit der duplexdestabilisierende Effekt einer einzelnen photolabilen Schutzgruppe weiter erhöht werden kann. Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein Screening durchgeführt, bei dem über eine Cu(I)-katalysierte Click-Reaktion verschiedene Triazol-Substituenten als sperrige Reste an photolabil Alkin-modifizierte Oligonukleotide angebracht wurden. Diese wurden daraufhin mittels Schmelzpunktstudien hinsichtlich ihrer Duplexstabilität untersucht.



Auf diese Weise konnte mit der DPMTC-Schutzgruppe ein Strukturmotiv identifiziert werden, welches die besten duplexdestabilisierenden Eigenschaften aufwies. Dabei wurde auch der Einfluss der absoluten Konfiguration an der chiralen photolabilen Schutzgruppe untersucht. Im Einklang mit ersten Ergebnissen aus einer Vorstudie von Steinert und Schäfert konnte dabei bestätigt werden, dass in allen Fällen die (S)-Konfiguration am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom weniger stabile Duplexe bildet. Auch die photochemischen Eigenschaften wiesen sich für die (S)-Konfiguration als besonders günstig heraus. Im Rahmen dieser Studie wurde außerdem eine enantioselektive Synthese für die Darstellung der Schutzgruppen-Alkohole entwickelt, die in zukünftigen Arbeiten einen direkten Zugang zu (S)-konfigurierten Schutzgruppen-Derivaten

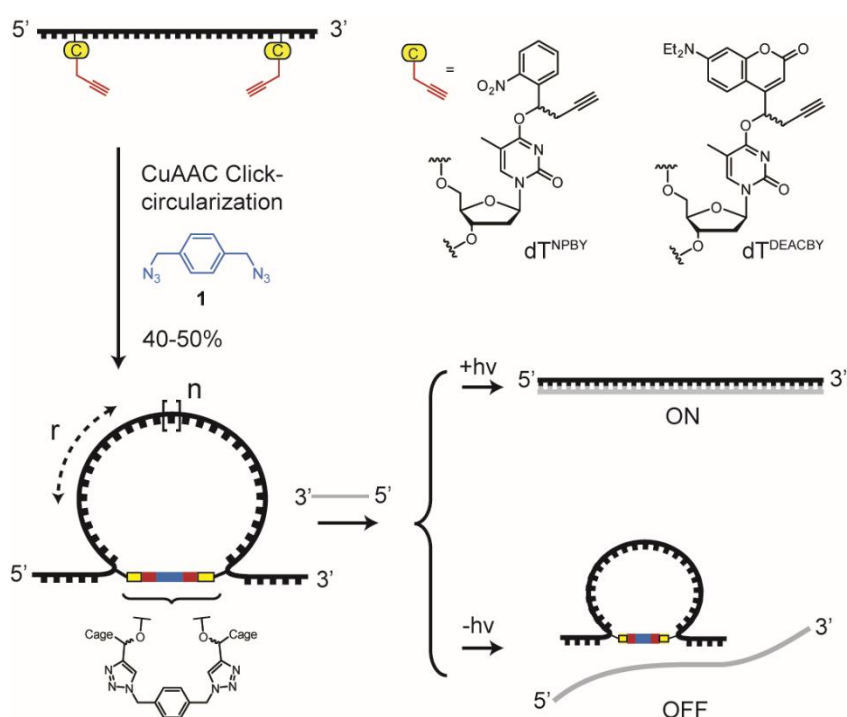
bietet. Zuletzt konnte mit Hilfe von Molekuldynamik-Simulationen ein Strukturmodell für die Wechselwirkung der sperrigen Schutzgruppen mit dem DNA-Duplex entwickelt werden. Dabei zeigte sich, dass der sperrige Triazolrest aus der großen Furche ins Lösungsmittel herausragt, während das Cumarin-Gerüst der photolabilen Schutzgruppe orthogonal gegen die anliegenden Wasserstoffbrückenbindungen gerichtet wird. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass in dieser Konformation die Natur des sperrigen Restes keinen großen Einfluss mehr auf die Lage des Schmelzpunktes hat, solange der Triazolrest insgesamt den größten sterischen Anspruch besitzt. Dieses Modell bietet eine Erklärung für das Auftreten einer Sättigung der Schmelzpunktwerte im Screening.





## Abstract

Within the last decades photolabile protecting groups have become a valuable tool for the investigation and regulation of biological processes. Photolabile protecting groups are attached to biomolecules in a manner, which renders them temporarily inactive. Upon irradiation with light the protecting group is removed and the biomolecule or the related process becomes reactivated. Since the two pioneering publications in 1977 by J.W. Engels and 1978 by J.F. Hoffman photolabile protecting groups have been used for caging of versatile biological molecule classes. In the special field of nucleic acids fundamental mechanisms have been explored and investigated recently, which allow also for therapeutic applications of photolabile protecting groups. An important criterion for efficient photoactivation of nucleic acids is the so called ON/OFF-triggering efficiency. Usually, the incorporation of one single photolabile modification does not completely deactivate the oligonucleotide in the caged state. This is rather achieved by incorporation of multiple protecting groups. Unfortunately, high irradiation doses and power have to be applied to fully restore activity, which reduces the time-resolution of light-activation and enhances the risk of photo-damage in the biological system. Thus, the major aim of this dissertation is the development of new architectures for photoactivatable oligonucleotides.



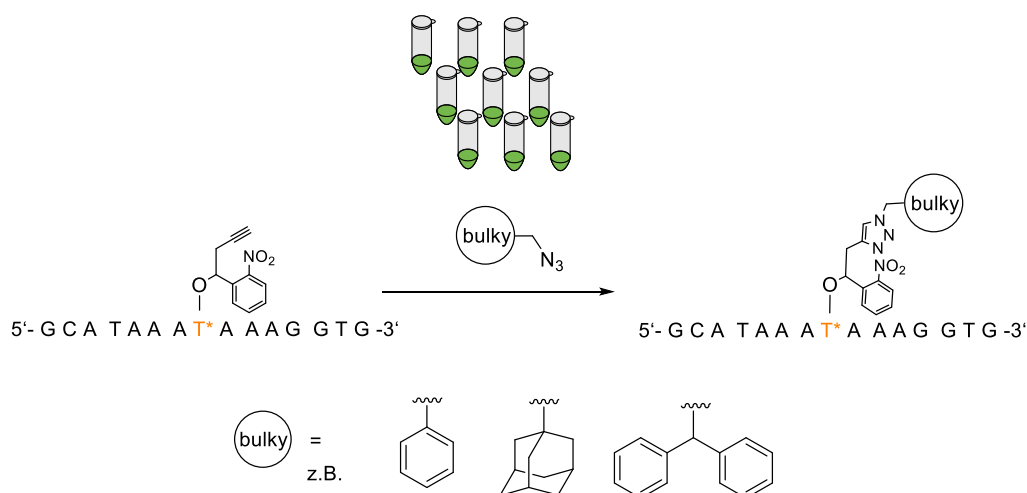
The key property of nucleic acids is the capability to form stable duplex structures. The first project of this thesis was based on the assumption, that cyclization of oligonucleotides suppresses duplex formation more efficiently due to global destabilization. Thus, efficient photoactivation could be achieved with a minimal number of photolabile modifications. For this

purpose, nitrobenzene- and coumarin-type photolabile protecting groups were modified with alkyne-residues and then attached to DNA nucleobases. Employing DNA solid phase synthesis photolabile and alkyne-modified oligonucleotides have been prepared, which could successfully be circularized intrasequentially via a Cu(I)-catalyzed click reaction with different bisazide-linkers. The circularized oligonucleotides revealed dramatically decreased melting temperatures both compared to the native and to the respective two-fold caged DNA species. Also it was found, that cyclization parameters as the linker length, flexibility and polarity, as well as the choice of the protecting group have no significant influence on the duplex stability. The melting temperatures were minimal within a range of ring sizes between approximately 11 to 21 nucleotides. However, very small and very large ring sizes (< 30 nt) exhibited considerably higher duplex stability. Encouraged by these results the concept of DNA cyclization was applied to the long functional C10 aptamer, which selectively binds to Burkitt's lymphoma cells. For this, the 90-mer oligonucleotide was modified at three positions with a photolabile alkyne-“anchor” and consecutively reacted with a trisazide-linker. By this, a bicircularized “photo-tethered” aptamer species was obtained, which showed almost no binding affinity against Burkitt's lymphoma cells in the caged state. However, after light irradiation binding and cell uptake of the C10 aptamer was restored efficiently. Atomic force microscopy experiments provided further insight into the structural changes upon photoactivation with molecular resolution. With these results, it is now possible to produce photoactivatable oligonucleotides in the full length-range of solid phase synthesis. In addition, caged oligonucleotides can be produced in a defined and effective manner even in cases where no (information about) functional secondary structures exist.

In the second project, cyclization of photolabile oligonucleotides was realized at the phosphate backbone of DNA. For this, photolabile alkyne-modifications were linked to phosphordiamidite building blocks and then converted into nucleoside building blocks, which could be used directly for the solid phase synthesis of photoactivatable oligonucleotides. Due to the low total number of synthetic steps (that is two steps) high amounts of phosphoramidite material could be produced in short time. Compared to cyclization via the nucleobases this is a major advantage of this strategy. Cu(I)-catalyzed click-cyclization was accomplished successfully and it could be shown, that duplex stability was reduced due to the cyclic conformation. In direct comparison with the nucleobase cyclization strategy the duplex destabilization is less effective, though. While it was suspected that hydrolysis might be an issue for caged phosphates, the cyclic oligonucleotides turned out to be stable even at high temperature. Encouraged by this a cyclic variant of an antisense oligonucleotide targeting the anti-apoptotic miR-34a was prepared, proving the compatibility of the cyclization approach even with more complex oligonucleotides including 2'-methoxy and phosphorothioate-modifications. A sample

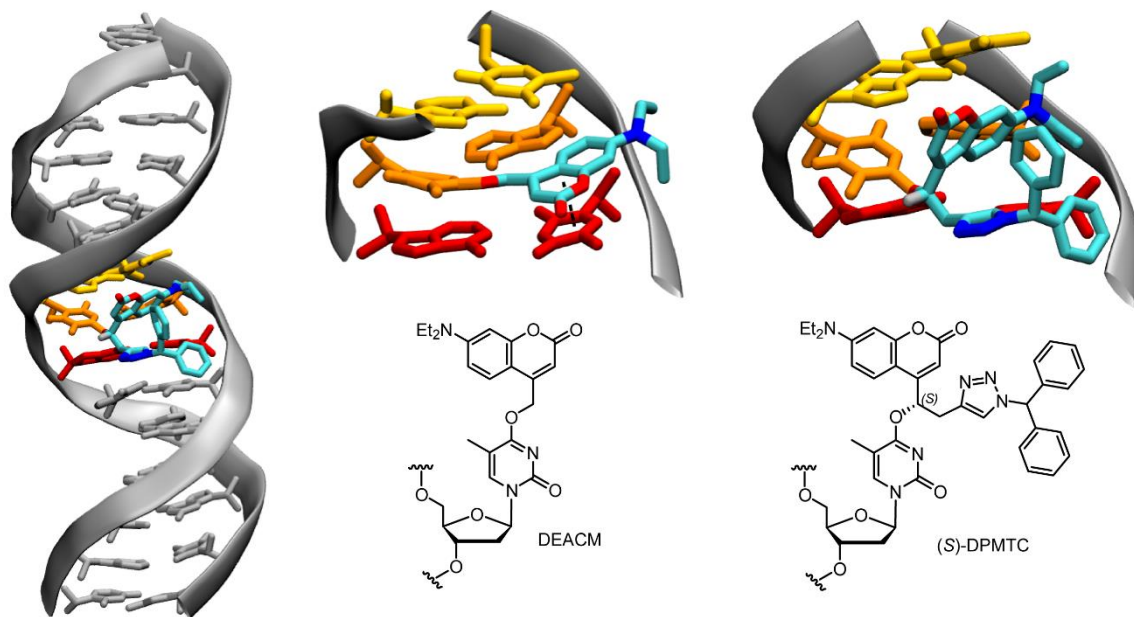
for prospective *in vivo* experiments for the light regulation of miR-34a expression is readily available now.

The third project of this thesis focused on the question, how much the effect of a single photolabile protecting group on duplex stability can be further enhanced. To answer this a screening was conducted via Cu(I)-catalyzed click reaction, in which different triazole substituents were attached to photolabile and alkyne-modified DNA. The influence of those bulky cages was analyzed then by melting temperature studies, in which the DPMTTC-cage could be identified as the most destabilizing structure motif.



In addition, the influence of the absolute configuration of the chiral photolabile protecting groups has been investigated. In agreement with previous results of Steinert and Schäfer it was found, that (*S*)-configuration at the  $\alpha$  carbon atom always leads to lower melting temperatures. Also the photochemical properties turned out to be more favourable for the (*S*)-configuration of the DPMTTC-cage. In the scope of this work also an enantioselective synthesis of the protecting group derivatives was developed. By this, (*S*)-configured alkyne-modified protecting groups are directly accessible for prospective studies and applications. Performing molecular dynamic simulations, the interaction of the bulky protecting groups with the DNA duplex was analyzed in more detail. It was shown, that the bulky triazole residue points out of the major groove into the solvent, whereas the coumarin moiety is directed orthogonally to the neighbouring base pairs. It was hypothesized that in this conformation the melting temperatures are not affected significantly by the individual nature of the bulky residue - as long as the triazole is the most repulsive substituent. This model provides an explanation for the observed saturation of melting temperatures values observed in the screening.

## VIII



**Teile dieser Doktorarbeit sind in folgenden Publikationen erschienen:**

*P. Seyfried, L. Eiden, N. Grebenovsky, G. Mayer, A. Heckel, Photo-Tethers for the (Multi-)Cyclic, Conformational Caging of Long Oligonucleotides. *Angew. Chem.* **2017**, 1, 365-369*

**Posterpräsentationen:**

DNG-Doktorandenseminar 29.-30.9.2014, Bad Herrenalb.

GRK 2039 meets CliC Frankfurt, 4.-6.4.2016, Lauterbad.

CEF/CliC Conference "Design and Light Control", 30.8.-1.9.2017, Niedernberg.

## Inhalt

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Photolabile Schutzgruppen</b> .....	1
1.1.1 Anforderungen an photolabile Schutzgruppen .....	1
1.1.2 <i>ortho</i> -Nitroaryl-Schutzgruppen.....	2
1.1.3 Cumarin-Schutzgruppen.....	5
1.1.4 Photolabile Schutzgruppen im VIS-Bereich .....	9
<b>1.2 Photoaktivierbare Oligonukleotide und ihre Anwendungsgebiete</b> .....	12
1.2.1 Strategien zum Aufbau photoaktivierbarer Oligonukleotide .....	12
1.2.2 Anwendungen photoaktivierbarer Oligonukleotide .....	13
1.2.2.1 Regulation der Genexpression .....	13
1.2.2.2 Aptamere zur Regulation der Proteinfunktion.....	16
1.2.2.3 Photoaktivierbare Oligonukleotide als Fluoreszenzsonden .....	18
1.2.3 Strategien zur Verbesserung der Photomodulationseffizienz (An-/Aus-Schaltbarkeit).....	20
<b>1.3 Festphasensynthese von (modifizierten) DNA- und RNA-Oligonukleotiden</b> ....	24
<b>1.4 Click-Chemie mit DNA und RNA</b> .....	29
1.4.1 Click-Chemie.....	29
1.4.2 Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC) .....	30
1.4.3 CuAAC Reaktion mit DNA und RNA .....	35
<b>2. Motivation und Zielsetzung</b> .....	37
<b>3. Ergebnisse und Diskussion</b> .....	40
<b>3.1 Synthese Alkin-modifizierter photolabiler Schutzgruppen</b> .....	40
3.1.1 Alkin-modifizierte <i>ortho</i> -Nitrobenzyl-Schutzgruppen .....	40
3.1.2 Alkin-modifizierte Cumarin-Schutzgruppen .....	44
3.1.2.1 7-Diethylamino-4-methylcumarin-Derivate .....	44
3.1.2.2 7-Diethylamino-4-methylthiocumarin-Derivate .....	46
<b>3.2 Synthese Alkin-modifizierter photolabiler DNA-Phosphoramidite</b> .....	48
3.2.1 Synthese des NPBY-geschützten Thymidin-Phosphoramidits .....	48
3.2.2 Synthese des NPPY-geschützten Thymidin-Phosphoramidits .....	49
3.2.3 Synthese des DEACBY-geschützten Thymidin-Phosphoramidits .....	51
3.2.4 Synthese der NPBY-geschützten Desoxycytidin-Derivate .....	52
3.2.5 Synthese der NPBY-geschützten Desoxyadenosin-Derivate .....	53
3.2.6 Synthese der DEACBY-geschützten Desoxyguanosin-Derivate .....	54
<b>3.3 Photoaktivierbare zyklisierte Oligonukleotide (Watson-Crick-Basenseite)</b> .....	55
3.3.1 Einleitung.....	55
3.3.2 Darstellung und Zyklisierung der Benchmark-Oligonukleotide.....	56

3.3.3	Zyklisierung der 32-mer Modell-DNA .....	61
3.3.3.1	Modellierung einer 32-mer DNA-Sequenz.....	61
3.3.3.2	Optimierung der CuAAC-Zyklisierung und Charakterisierung der zyklisierten 32-mer Modell DNA .....	62
3.3.3.3	Variation der Zyklisierungsparameter .....	67
3.3.3.4	Photochemische Charakterisierung der zyklischen 32-mer DNA .....	69
3.3.4	Darstellung und Untersuchung eines bizyklisierten C10-Aptamers.....	78
3.3.5	Zusammenfassung und Ausblick .....	85
3.4	Photoaktivierbare zyklisierte Oligonukleotide (Phosphatrückgrat-Strategie) .	87
3.4.1	Einleitung.....	87
3.4.2	Synthese der photolabil geschützten Phosphoramidit-Bausteine .....	88
3.4.3	CuAAC-Zyklisierung von Oligonukleotiden über das Phosphatrückgrat .	93
3.4.4	Darstellung einer zyklisierten, photoaktivierbaren AntimiR-34a.....	95
3.4.5	Zusammenfassung und Ausblick .....	98
3.5	Maximierung des Duplex-destabilisierenden Effekts einer einzelnen photolabilen Schutzgruppe mit Hilfe eines CuAAC-Screenings .....	100
3.5.1	Einleitung.....	100
3.5.2	Synthese einer Bibliothek von Azid-Substituenten .....	102
3.5.3	Post-synthetische CuAAC auf DNA mit sperrigen Azid-Substituenten...	103
3.5.4	Zuordnung der absoluten Konfigurationen im Click-Screen.....	106
3.5.4.1	Enantioselektive Synthese der NPBY- und DEACBY-Schutzgruppen....	106
3.5.4.2	Mosher-Ester-Analysen und Röntgenkristallstruktur-Analysen .....	110
3.5.4.3	Synthese des diastereomerenreinen dT <sup>(R)</sup> -DEACBY-Phosphoramidits zur Zuordnung der absoluten Konfigurationen im Click-Screening.....	114
3.5.5	Einfluss der sperrigen Triazol-Substituenten auf die Duplexstabilität photoaktivierbarer DNA.....	116
3.5.6	Photochemische Charakterisierung der DPMTc-Schutzgruppe .....	119
3.5.7	Untersuchung photolabil geschützter DNA mit Molekulardynamik- Simulationen.....	120
3.5.8	Zusammenfassung und Ausblick .....	124
4.	Experimenteller Teil.....	126
4.1	Materialien und Methoden.....	126
4.2	Synthesevorschriften .....	129
4.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	129
4.2.2	Synthese der photolabilen Schutzgruppen-Vorläufer .....	129
4.2.3	Synthese der Alkin-modifizierten photolabilen Phosphoramidit-Bausteine 142	
4.2.4	Synthese der Azid-Verbindungen .....	175

4.3	Darstellung und Charakterisierung photolabil modifizierter Oligonukleotide	181
5.	Anhang	199
5.1	Literaturverzeichnis	199
5.2	Abkürzungsverzeichnis	207
5.3	Danksagung	211
5.4	Lebenslauf	213



## 1. Einleitung

### 1.1 Photolabile Schutzgruppen

Photolabile Schutzgruppen vollziehen durch Absorption von Licht den Bruch einer chemischen Bindung und setzen dadurch eine vormals geschützte Abgangsgruppe frei. Im biochemischen Kontext ist eine solche Abgangsgruppe in der Regel Teil eines funktionellen Biomoleküls, beispielsweise eines Neurotransmitters, eines Proteins oder eines Oligonukleotids. Durch die Verknüpfung mit der photolabilen Schutzgruppe soll die Funktion eines Moleküls temporär inhibiert werden. Erst durch Licht und die damit einhergehende Photolysereaktion wird die Aktivität kontrolliert wiederhergestellt. Während Silyl-, Trityl-, Acetyl- und andere klassische Schutzgruppen aus der Synthesechemie einen molekularen Reaktionspartner (z.B. Fluorid-Ionen, Säuren, Basen oder Wasserstoff) zur Abspaltung benötigen, bedarf es zur Abspaltung photolabiler Schutzgruppen nicht der externen Zugabe von Reaktanten. Ganz im Gegenteil dazu kann Licht in Ultrakurzzeit, mit hoher Ortsauflösung und genauer Dosierung angewendet werden. Da Licht darüber hinaus Zellen und Gewebe penetrieren kann, dabei aber bei geeigneten Wellenlängen nur die Photolyse der photolabilen Schutzgruppe bewirkt, stellt Licht ein selektives und damit optimales Auslöse-Signal zum Schalten biologischer Prozesse dar. Erstmals im Jahre 1962 in der chemischen Synthese verwendet<sup>[1,2]</sup>, hat sich für photolabile Schutzgruppen seither ein breites Anwendungsspektrum entwickelt: Sie dienen zum einen der Untersuchung und Aufklärung der Funktion biologischer Moleküle wie Proteine, Nucleinsäuren und Neurotransmitter in komplexen Zell-Netzwerken. Photolabil geschützte Fluorophore finden Einsatz in hochauflösenden Mikroskopietechniken wie z.B. PALM (photoactivated localization microscopy). Therapeutische Wirkstoffe werden mit photolabilen Schutzgruppen modifiziert oder in geeignete, photoaktivierbare Drug-Delivery-Systeme eingebettet, um eine präzise dosierte, nebenwirkungsarme Behandlung von Krankheiten zu ermöglichen.<sup>[3]</sup> Aber auch in den Materialwissenschaften erfreuen sich photolabile Schutzgruppen vor allem im Zusammenhang mit Techniken wie der Zwei-Photonen-Anregung großer Beliebtheit, z.B. bei der Mikrofabrikation von (Bio-)materialien durch licht-gesteuerte Polymerisations-Reaktionen. Schließlich finden photolabile Schutzgruppen auch in Totalsynthesen von Naturstoffen Verwendung, beispielsweise zur Darstellung von Calicheamycin  $\gamma$ <sup>[4]</sup> und Diazonamid A<sup>[5]</sup>.

#### 1.1.1 Anforderungen an photolabile Schutzgruppen

Photolabile Schutzgruppen werden in erster Linie über die Photolyse-Effizienz  $\varepsilon(\lambda) \cdot \varphi$  charakterisiert. Dabei bezeichnet  $\varepsilon(\lambda)$  den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten bei der spezifischen Wellenlänge  $\lambda$ , und die Quantenausbeute  $\varphi$  ergibt sich aus dem Anteil an Photonen, welcher eine Photolysereaktion bewirkt, pro Gesamtanzahl an absorbierten Photonen. Für biologische Anwendungen ist eine hohe Photolyse-Effizienz bei Wellenlängen größer als 300 nm wünschenswert. Unterhalb dieser Grenze existiert bei Bestrahlung ein

hohes Risiko für das Auftreten von Photoschäden, die sich beispielsweise in Form von Pyrimidin-Dimeren in DNA äußern. Die Photolyse-Reaktion sollte ohne Nebenreaktionen selektiv das Zielmolekül freisetzen. Das Reaktionsprodukt der photolabilen Schutzgruppe sollte im chemischen oder biologischen System inert bzw. nicht toxisch sein und im Optimalfall nicht bei derselben Wellenlänge absorbieren wie die photolabil geschützte Verbindung selbst (interner Filter). Ohne Einwirkung von Licht soll das photolabil geschützte Zielmolekül im Medium stabil sein, also z.B. nicht hydrolysiert werden können. Wird die photolabile Schutzgruppe zur Untersuchung schneller Prozesse eingesetzt, so muss die Photolyse eine entsprechend höhere Photolyserate aufweisen. Darüber hinaus muss sie so an das Zielmolekül verknüpft werden können, dass nach Möglichkeit vor Belichtung eine vollständige Deaktivierung erreicht wird. Für viele Anwendungen spielt außerdem Löslichkeit und Transport im Medium eine große Rolle, weswegen unter Umständen hydrophile oder hydrophobe Reste an die photolabile Schutzgruppe angebracht werden müssen.

Experimente mit besonders hoher Ortsauflösung und Eindringtiefe in Materialien können mit Hilfe von Zwei-Photonen-Anregung realisiert werden. Hierzu müssen neben einer hohen Photonendichte (durch gepulste IR-Laser) auch photolabile Schutzgruppen mit einem großen Zwei-Photonen-Einfangsquerschnitt  $\delta$  [GM] zur Verfügung stehen.  $\delta$  ist, analog dem Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon(\lambda)$  in der Ein-Photonen Absorption, ein Maß für die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Zwei-Photonen-Absorption. Die Güte einer Zwei-Photonen-Schutzgruppe ergibt sich entsprechend aus dem Produkt von  $\delta$  mit der Zwei-Photonen-Quantenausbeute  $\Phi$ . Die Größe  $\delta_{\text{eff}} = \delta \cdot \Phi$  [GM] bezeichnet man auch als Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt.

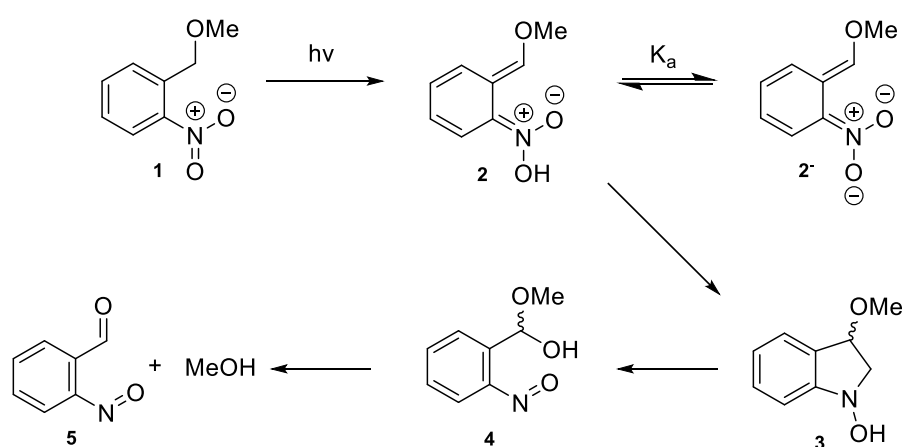
Keine der heute verfügbaren Schutzgruppen-Klassen erfüllt alle diese Kriterien gleichermaßen gut und es muss genau abgewogen werden, welche Eigenschaften für die jeweilige Anwendung im Vordergrund stehen müssen. So spielt die Löslichkeit der photolabilen Schutzgruppe bei Oligonukleotiden aufgrund des anionischen Phosphat-Rückgrats in der Regel keine Rolle. Alles andere als trivial stellt sich dagegen das Erreichen einer vollständigen Deaktivierung im photolabil geschützten Zustand heraus.

Im folgenden Abschnitt werden zunächst einige wichtige Klassen photolabiler Schutzgruppen mit ihren individuellen Eigenschaften vorgestellt.

### 1.1.2 *ortho*-Nitroaryl-Schutzgruppen

Die ältesten und zugleich am häufigsten in der Literatur eingesetzten Vertreter photolabiler Schutzgruppen basieren auf einer *ortho*-Nitrobenzyl-Struktur. Einer der großen Vorteile dieser Schutzgruppen-Klasse ist die Kompatibilität mit einer breiten Palette funktioneller Gruppen, von welchen vor allem Alkohole, Amine, Thiole, Carbonsäure und Phosphate eine große

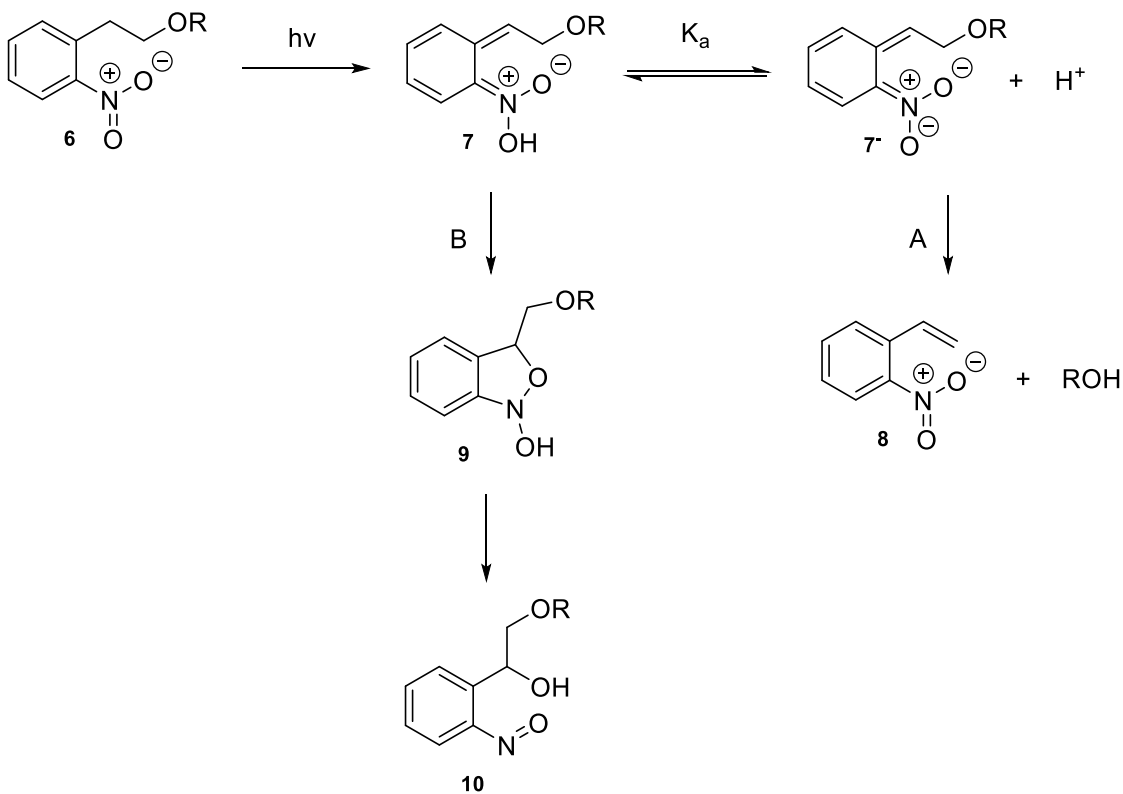
biologische Relevanz besitzen. Der vereinfachte Photolyse-Mechanismus von *ortho*-Nitrobenzylmethylether **1** ist in Schema 1 dargestellt.<sup>[6,7]</sup> Durch elektronische Anregung mit UV-Licht wird zunächst das benzyliche Proton umgelagert und *aci*-Nitroverbindung **2** gebildet. Aus Studien an *ortho*-Nitrotoluol weiß man, dass diese 1,5-Protonenumlagerung bei genauerer Betrachtung in der eigentlichen Photoreaktion über einen diradikalischen Triplett-Zustand verläuft.<sup>[8]</sup> Verbindung **2** steht im Gleichgewicht mit der deprotonierten Form, welche jedoch nicht den darauffolgenden Schritt der Zyklisierung zu Benzisoxazolidin **3** eingeht. Aus **3** erfolgt die Umlagerung zum Halbacetal **4** und schließlich unter Eliminierung der Abgangsgruppe (Methanol) die Bildung von Nitrosoaldehyd **5**.



**Abb. 1** Photolyse-Mechanismus von *ortho*-Nitrobenzylmethylether **1**<sup>[6,7]</sup>

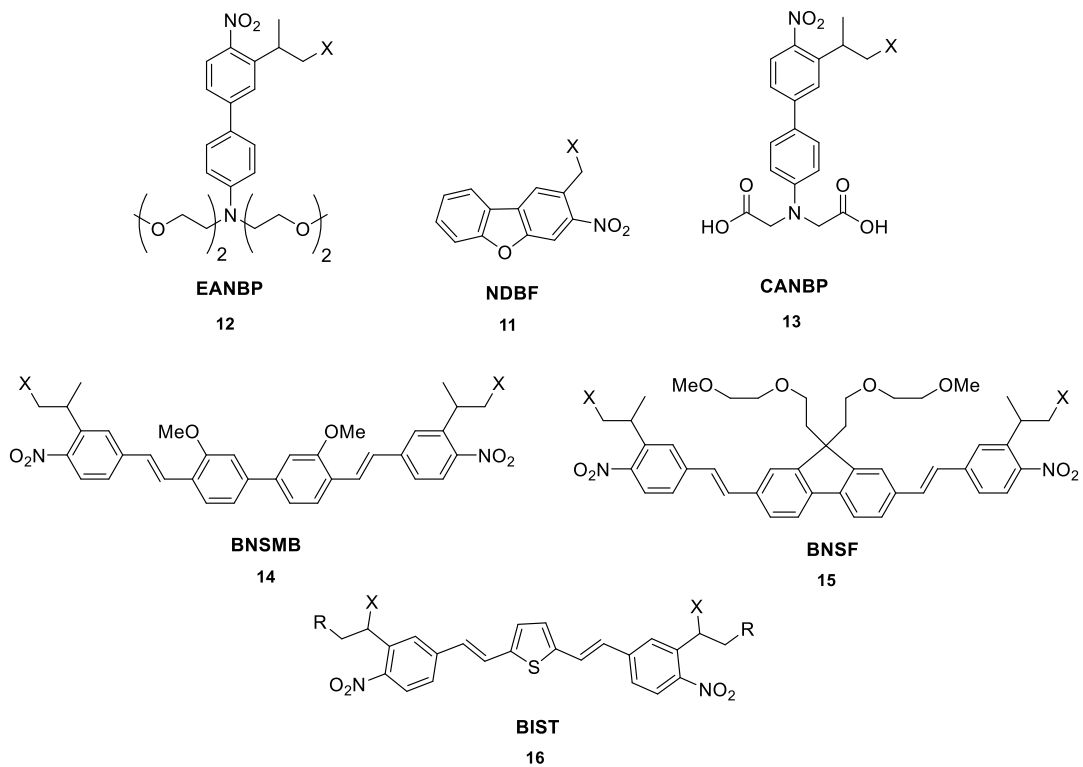
Die unmodifizierte *ortho*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe (*o*-NB) weist einige Nachteile auf, welche die Entwicklung vielfältiger Derivate mit verbesserten Eigenschaften angeregt hat. So ist das Photolyseprodukt der unmodifizierten *ortho*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe ein reaktiver Nitrosoaldehyd, der insbesondere im biologischen Medium potentiell toxische Nebenreaktionen eingehen kann. Durch Substituenten, wie beispielsweise eine CH<sub>3</sub>- (NPE-Schutzgruppe) oder CF<sub>3</sub>-Gruppe in benzylicher Position, wird nicht nur ein weniger reaktives Keton freigesetzt, sondern zugleich auch die Stabilität des intermediären diradikalischen Triplett-Zustands und damit die Quantenausbeute erhöht.<sup>[9]</sup> Die von Hasan, Pfeleiderer *et al.* entwickelten *ortho*-Nitro-2-phenethyloxycarbonyl-Schutzgruppen (NPEOC) setzen bei Belichtung ein weniger reaktives Nitrostyrol-Derivat frei und weisen erhöhte Photolyseraten (Größenordnung 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>) auf. Der Mechanismus verläuft hierbei für gute Abgangsgruppen wie Carbonate über eine  $\beta$ -Eliminierung (Abb. 2, Reaktionspfad A) aus der deprotonierten *aci*-Nitro-Verbindung **7**.<sup>[6,10,11]</sup> Schlechte Abgangsgruppen bzw. pH-Bedingungen, bei denen die neutrale *aci*-Nitro-Verbindung **7** vorliegt, führen zur Bildung von Benzoxazolidin **9**, welches

sich ohne Abspaltung der Abgangsgruppe zu Nitroso-Derivat **10** öffnet (Abb. 2, Reaktionspfad B).



**Abb. 2** Photolyse-Mechanismus der *ortho*-Nitro-2-phenethyloxycarbonyl-Schutzgruppe (NPEOC).<sup>[6,10,11]</sup> Reaktionspfad A führt zur Freisetzung der Abgangsgruppe ( $\text{ROH}$ ), wohingegen schlechte Abgangsgruppen gemäß Reaktionspfad B am finalen Nitroso-Derivat verknüpft bleiben.

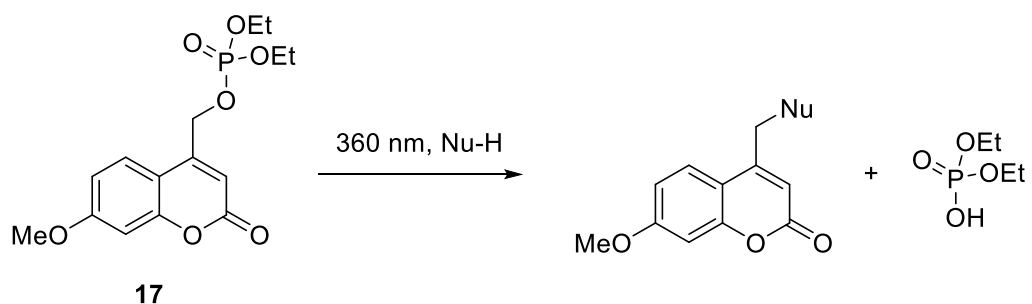
Weitere Modifikationen der Nitrobenzyl-Schutzgruppen zielen vor allem auf die Verschiebung des Absorptionsmaximums hin zu höheren Wellenlängen ab. Ein häufig angewendetes Prinzip ist hierbei die Vergrößerung des delokalisierten  $\pi$ -Elektronen-Systems. Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die Nitrodibenzofuran-Schutzgruppe (NDBF) von Ellis-Davies *et al.*, welche in der Literatur vor allem zur licht-gesteuerten Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen verwendet wurde (Abbildung 3).<sup>[12]</sup> Hohe Quantenausbeuten von ( $\varphi = 0,7$ ) bei gleichzeitig großem Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon(350 \text{ nm}) = 15,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) zeichnen diese Derivate aus. Darüber hinaus besitzt die NDBF-Schutzgruppe einen signifikanten Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt, wodurch unter Verwendung geeigneter Laser-Setups auch eine Photolyse durch Zwei-Photonen-Absorption mit Nahinfrarotlicht ( $> 760 \text{ nm}$ ) angeregt werden kann. Zur Erhöhung des Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitts wurden zahlreiche bipolare und quadrupolare Donor-Akzeptor-Systeme entwickelt, beispielsweise die EANBP<sup>[13]</sup> (11 GM bei 800 nm) und CANBP<sup>[14]</sup>, BNSMB und BNSF-Schutzgruppe<sup>[15]</sup> von Goeldner, Specht *et al.* oder die Bisstyrylthiophen-Modifikation der Nitrobenzylschutzgruppe von Ellis-Davies *et al.*<sup>[16]</sup> (Abbildung 3).



**Abb. 3** Strukturübersicht einiger Nitrobenzyl-Schutzgruppen-Derivate mit bathochrom verschobenem Absorptionsmaximum und Zwei-Photonen-Aktivität

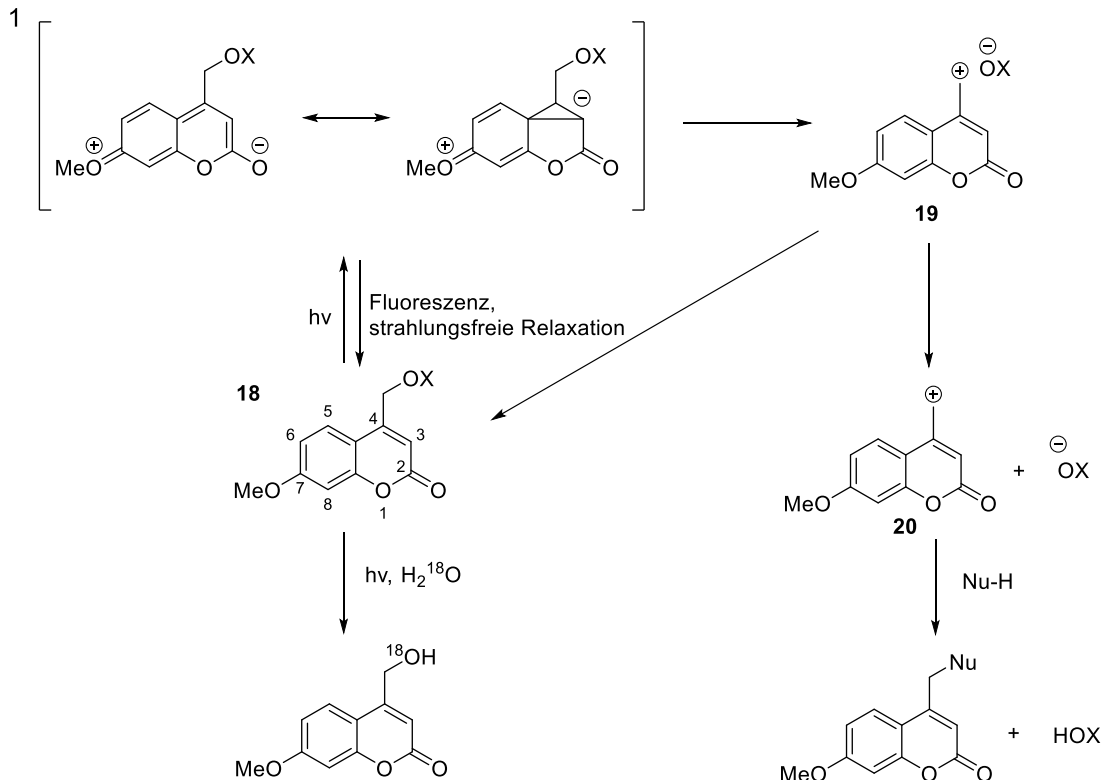
### 1.1.3 Cumarin-Schutzgruppen

Der Naturstoff Cumarin und dessen Derivate werden unter anderem als Aromastoffe, als Blutgerinnungshemmer (z.B. Warfarin) und als Fluoreszenz-Farbstoffe (z.B. Alexa Fluor® 350 und 430) verwendet. Mit Absorptionsmaxima vom nahen UV bis ins Blaulicht hinein reichend eignen sich 4-Methyl-Cumarin-Derivate darüber hinaus bestens als photolabile Schutzgruppen. Givens *et al.* berichteten bereits im Jahre 1984 über die Photolyse eines 7-Methoxycumarin-geschützten Diethylphosphates (Abbildung 4).<sup>[17]</sup>



**Abb. 4** Photolyse von 7-Methoxycumarin-geschütztem Diethylphosphat<sup>[17]</sup>

Im Allgemeinen zeichnen sich Cumarin-Schutzgruppen gegenüber Nitrobenzyl-Schutzgruppen durch höhere molare Extinktionskoeffizienten bei höheren Wellenlängen und schnellere Photolyseraten (Größenordnung  $10^9 \text{ s}^{-1}$ ) aus. Der Photolyse-Mechanismus für Cumarin-geschützte Verbindungen wurde detailliert von Schade *et al.* untersucht und ist in Abbildung 5 zusammengefasst.<sup>[18–20]</sup>

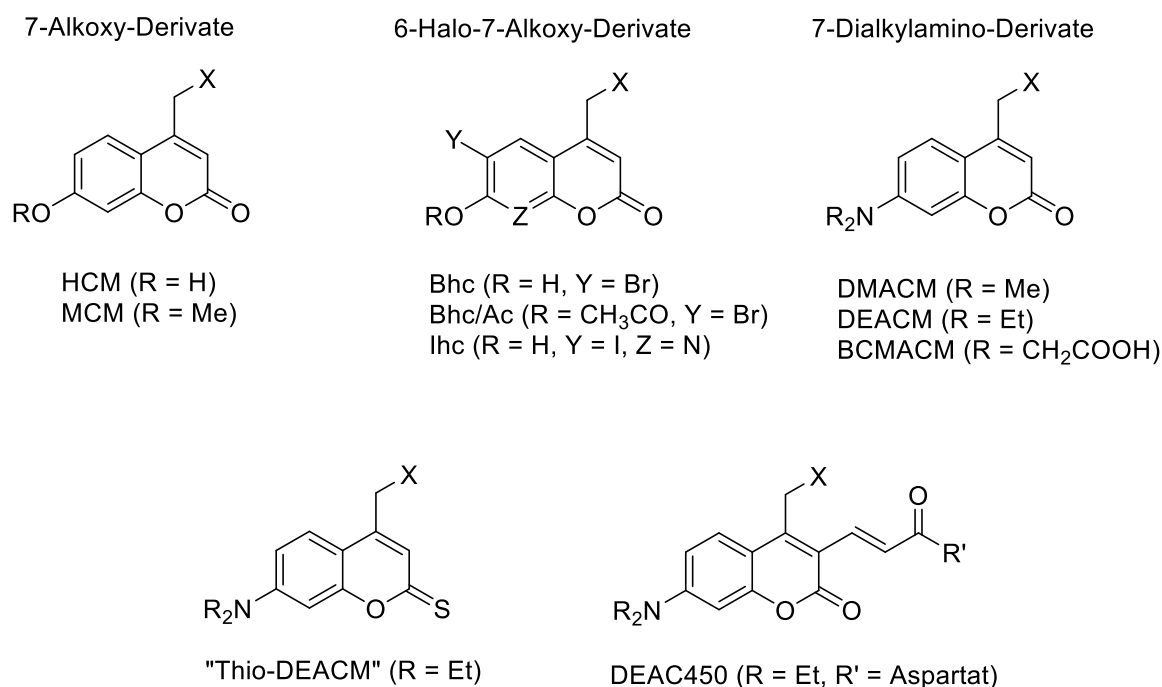


**Abb. 5** Photolyse-Mechanismus der (7-Methoxy-)Cumarin-Schutzgruppe<sup>[18,20]</sup>

Durch Absorption von Licht wird das Cumarin zunächst in den elektronischen  $S^1$ -Zustand angeregt. Dabei wird Ladungsdichte vom donierenden Substituenten in 7-Position in den aromatischen Ring geschoben. Wie durch Isotopenmarkierungsexperimente belegt, findet im angeregten Zustand ein heterolytischer Bindungsbruch zwischen C-4 und der Abgangsgruppe statt. Das dabei entstehende Kation wird durch die erhöhte Ladungsdichte im Cumarin-System stabilisiert. Es folgt die Trennung des entstehenden Kontaktionenpaars durch das Lösungsmittel. Dieser Schritt ist ratenlimitierenden und konkurriert direkt mit der raschen Rekombination des Ionenpaars in den Grundzustand. Bei erfolgreicher Solvation addiert schließlich entweder das Lösungsmittel direkt oder ein alternativ vorhandenes Nukleophil an das Cumarin, während die Abgangsgruppe protoniert wird. Die Quantenausbeute der Photolyse hängt, wie für 7-Methoxy-Cumarin gezeigt, stark davon ab, wie gut das Lösungsmittel das Kontaktionenpaar zu stabilisieren vermag. In unpolaren Lösungsmitteln

dominiert vor allem die strahlungsfreie Relaxation aus dem elektronisch angeregten Zustand. Mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels steigt zunächst die Quantenausbeute der Fluoreszenz an, welche dann aber in sehr polaren Lösungsmitteln von der Quantenausbeute der Photolyse übertroffen wird. Daraus lässt sich zum einen schließen, dass sich Cumarine besonders für Anwendungen in wässrigem Medium (z.B. Zellmedium) eignen. Zum anderen erklärt sich dabei auch die häufig beobachtete Fluoreszenzzunahme nach der Entschützung von Cumarin-Derivaten. Diese lässt sich prinzipiell zum Monitoring des Entschützungsvorgangs ausnutzen.

Zur ersten Generation photolabiler Cumarin-Schutzgruppen gehören die 7-Alkoxy-Derivate HCM und MCM (Abbildung 6). Die Absorptionsmaxima dieser Verbindungen reichen in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und der Abgangsgruppe von 310 bis 330 nm, die molaren Extinktionskoeffizienten liegen zwischen 4000 und 12000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> und die Quantenausbeuten typischerweise bei  $\phi \approx 0,1$ .<sup>[20,21]</sup> Die nur sehr geringe Wasserlöslichkeit, sowie die noch deutlich im UV befindliche Absorption führten zur Entwicklung zahlreicher verbesserter Cumarin-Schutzgruppen. Das Einführen eines Brom-Substituenten an C-6 (Bhc-Schutzgruppe) erhöht durch den induktiven Effekt die Azidität der 7-Hydroxy-Gruppe, sodass diese bei physiologischem pH deprotoniert vorliegt und somit eine bessere Löslichkeit aufweist. Die Maskierung der 7-Hydroxy-Gruppe durch Acetylierung (Bhc/Ac-Schutzgruppe) dagegen erhöht die Membrangängigkeit für *in vivo* Anwendungen.



**Abb. 6** Strukturen wichtiger Vertreter der photolabilen Cumarin-Schutzgruppe, X = Abgangsgruppe

Einen dramatischen Einfluss hat die Bromierung außerdem auf die Lage des Absorptionsmaximums. Dieses liegt für Bhc bathochrom verschoben bei 370-376 nm mit molaren Extinktionskoeffizienten zwischen 13000 und 19000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Darüber hinaus eignet sich Bhc für Zwei-Photonen-Anwendungen. Furuta *et al.* stellten auf der einen Seite fest, dass sich das Einführen elektronegativer Substituenten an Position C-6 über die Quantenausbeute negativ auf die Photolyseeffizienz auswirken kann.<sup>[21]</sup> Auf der anderen Seite wird dieser Einfluss jedoch vom sogenannten Schweratom-Effekt („Heavy atom effect“) kompensiert. Dieser besagt, dass durch die Spin-Bahn-Kopplung zwischen einem Atomorbital des Schweratoms und dem Molekülorbital des Chromophoren die Wahrscheinlichkeit für Inter System Crossing (ISC) aus dem angeregten Singulett- in den Triplett-Zustand erhöht wird.<sup>[22]</sup> Ein solcher elektronischer Übergang, bei dem sich die Multiplizität ändert, ist unter normalen Bedingungen streng verboten. Aus dem Triplett-Zustand heraus ist die Solvation des Kontaktionenpaars gegenüber der Rekombination begünstigt, wodurch sich die Quantenausbeute für die Photolyse erhöht. Entsprechend wirkt sich die Substitution von Brom mit dem schwereren Iod an Position C-6 durch eine nochmals dramatische Erhöhung der Quantenausbeute aus auf Werte bis zu  $\varphi = 0,51$  im Falle von 8-Aza-Ihc-geschütztem Acetat.<sup>[23]</sup> Ein weiterer großer Schritt wurde durch die Entwicklung der stark donierenden 7-Dialkylaminocumarine vollzogen. Die Absorptionsmaxima liegen für Derivate wie DMACM und DEACM bei teilweise über 400 nm mit molaren Extinktionskoeffizienten von ca. 20000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Außerdem wurden hohe Quantenausbeuten von bis zu  $\varphi = 0,28$  ermittelt. Über die Reste an der 7-Amino-Funktion werden üblicherweise weitere Funktionalitäten eingeführt, beispielsweise Säuregruppen zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit (BCMACM). Jullien *et al.* konnten zeigen, dass das Austauschen der Cumarin-Carbonylgruppe durch eine Thiocarbonylgruppe eine weitere bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums auf ca. 470 nm bewirkt.<sup>[24]</sup> Der molare dekadische Extinktionskoeffizient beträgt bei dieser Wellenlänge hohe Werte von 27000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, wobei eine signifikante Absorption von Licht mit Wellenlängen über 500 nm ebenfalls beobachtet wird. Trotz einer relativ geringen Quantenausbeute von nur  $\varphi = 0,005$  ergeben sich Photolyseeffizienzen in der gleichen Größenordnung wie die der Nitrobenzyl-Schutzgruppen. Konsequenterweise nach dem Prinzip der Vergrößerung des delokalisierten  $\pi$ -Systems entwickelten Ellis-Davies *et al.* die DEAC450-Schutzgruppe mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 43000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bei 456 nm und sehr hohen Quantenausbeuten von bis zu  $\varphi = 0,78$  (cAMP als Abgangsgruppe).<sup>[25]</sup> In derselben Studie wurden unter Verwendung von DEAC450 neuronale Aktionspotentiale durch Zwei-Photonen-Anregung ausgelöst.

Neben den zahlreichen Vorteilen der Cumarin-Schutzgruppen müssen jedoch auch einige Einschränkungen berücksichtigt werden. Während sich Phosphate, Carboxylate und Sulfonate bestens als Abgangsgruppen für Cumarine eignen, stellt sich ein direkter C-N oder C-S-

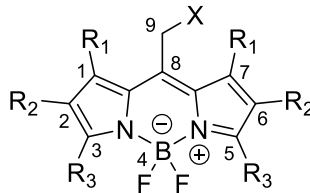


Bindungsbruch, wie beispielsweise der Fall für Amine oder Thiole, als sehr schwierig bis unmöglich heraus. Für einige Anwendungen kann in diesem Fall auf Carbamat- oder Thiocarbonat-Funktionalitäten umgestiegen werden, bei denen CO<sub>2</sub> im Zuge der Photolyse freigesetzt wird. Häufig werden dann aber Photolyse-Nebenprodukte beobachtet, die vor allem auf die Rekombination des angeregten Kontaktionen-Paars zur stabilen C-N oder C-S-Bindung zurückzuführen sind. Hagen *et al.* beobachteten eine Photoisomerisierungsreaktion für Thioether-Abgangsgruppen von der C4- in die C3-Position.<sup>[26]</sup> Folglich konnte kürzlich durch Blockade der C3-Position mit einer Methyl-Gruppe von Distefano *et al.* ein Bhc-Derivat für Thiol-Abgangsgruppen entwickelt werden, welches keine Photolyse-Nebenprodukte mehr erzeugt.<sup>[27]</sup>

#### 1.1.4 Photolabile Schutzgruppen im Vis-Bereich

Sowohl für Untersuchungen in biologischem Medium als auch für therapeutische Anwendungen von photolabilen Schutzgruppen im menschlichen Organismus ist es entscheidend, dass das eingestrahlte Licht in nennenswerter Ausbeute von der photolabil geschützten Verbindung absorbiert wird. Im UV-Bereich aber auch in einem großen Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichts (z.B. durch Hämoglobin und Melanin) und insbesondere ab dem Nahinfrarot (z.B. durch Wasser) tritt eine starke Absorption bzw. Streuung durch Gewebe auf. Daraus ergibt sich das sogenannte „therapeutische Fenster“ für die effiziente Eindringtiefe von Licht in Gewebe (ca. 650 – 950 nm).<sup>[28]</sup> Ein großes Augenmerk bei der gegenwärtigen Weiterentwicklung von photolabilen Schutzgruppen liegt daher auf der Verschiebung der Absorptionsmaxima in den Bereich des therapeutischen Fensters. Dabei gilt es zu beachten, dass mit zunehmender Wellenlänge die Energie der Photonen abnimmt. Die Art und Stärke der chemischen Bindung gibt jedoch eine Mindestenergie für den lichtinduzierten Bindungsbruch vor. Geht man für eine kovalente C-O-Bindung von einer Bindungsenergie von 358 kJ/mol aus, entspricht dies einer Wellenlänge von 333 nm. Gegenüber kovalenten Bindungen weisen koordinative Bindungen typischerweise reduzierte Bindungsenergien auf, die einer Lichtwellenlänge im sichtbaren Bereich entsprechen. Ein bekanntes Beispiel hierfür sind oktaedrische Ruthenium- und Platinkomplexe vom Typ  $[M(\text{bpy})_2\text{XY}]^{n+}$  mit M = Ru, Pt und X, Y = Aminen<sup>[29]</sup>, Nitrilen<sup>[30]</sup>, Aziden<sup>[31]</sup> oder Thioethern<sup>[32]</sup> als Abgangsgruppen. Durch Belichtung mit Wellenlängen über 480 nm (Grünlicht) oder durch Zwei-Photonen-Anregung wird der schwächere der Liganden jeweils durch einen Lösungsmittelliganden substituiert. Einen weiteren Ansatz stellt die Verwendung von Cobalaminen als photolabile Schutzgruppen dar.<sup>[33]</sup> Die darin enthaltene Co-C-Bindung weist Bindungsenergien von nur etwa 125 bis 184 kJ/mol auf, welche durch die Absorption bei bis zu 600 nm des Porphyrin-Komplexes homolytisch gespalten werden kann. Das System eignet sich auch zur lichtgesteuerten Freisetzung von Thiolaten.<sup>[34]</sup>

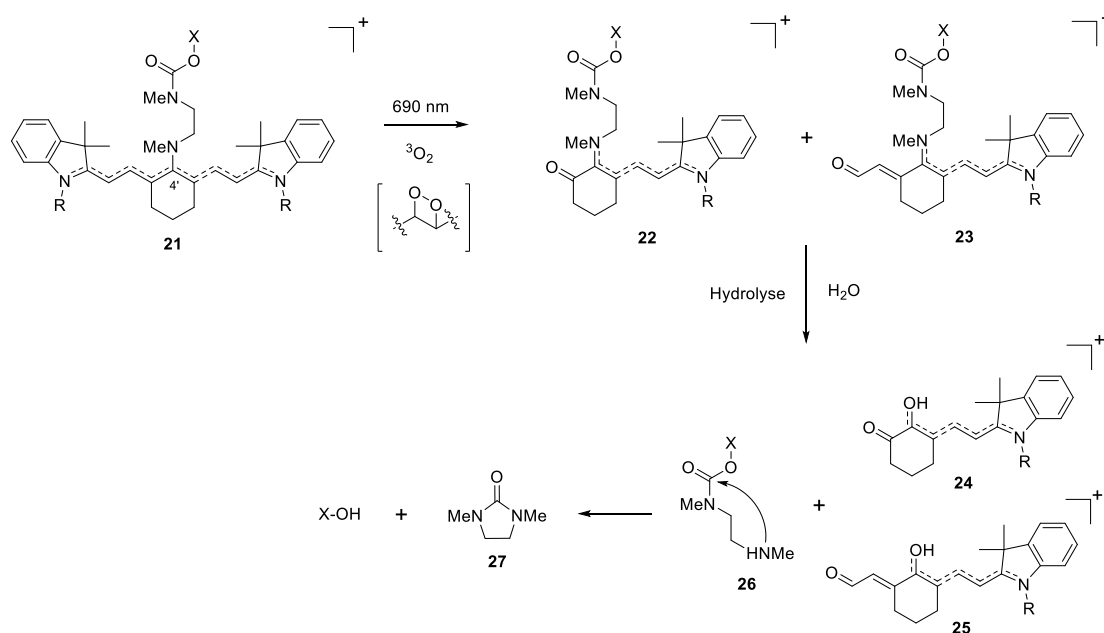
Im Jahre 2015 demonstrierten gleich drei Arbeitsgruppen (Klán *et al.*, Winter *et al.* und Weinstein *et al.*) unabhängig voneinander die Verwendung von BODIPY- (Bordipyromethin-) Derivaten als photolabile Schutzgruppe.<sup>[35–37]</sup> Der BODIPY-Chromophor zeichnet sich im Allgemeinen durch einen synthetisch einfachen Zugang, hohe molare Extinktionskoeffizienten im sichtbaren Wellenlängenbereich, starke Fluoreszenz und Biokompatibilität aus.



**Abb. 7** Struktur und IUPAC-Nummerierung der BODIPY-Schutzgruppe

Die Photolyse der von BODIPY-geschützten Acetaten findet an der *meso*-Methylposition 9 statt (Abbildung 7). Basierend auf TD-DFT Berechnungen von Winter *et al.* und unpublizierten Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe Klán *et al.* geht man derzeit von einem Mechanismus ähnlich dem der Cumarin-Photolyse aus, bei der in Folge der elektronischen Anregung zunächst ein heterolytischer Bindungsbruch zwischen C9 und der Abgangsgruppe stattfindet, wobei ein formales Kation am BODIPY-Gerüst verbleibt. Alkyl-substituierte BODIPY-Derivate weisen eine sehr niedrige Photolyse-Quantenausbeute in der Größenordnung von  $10^{-4}$  auf, die jedoch in Hinblick auf die Photolyseeffizienz durch extrem hohe molare Extinktionskoeffizienten von bis zu  $70000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei ca. 550 nm kompensiert wird. Hauptsächlich relaxiert der angeregte elektronische Zustand über Fluoreszenz in den Grundzustand. Eine Substitution in 2,6-Position mit Schweratomen wie Iod führt zu deutlich erhöhten Photolyse-Quantenausbeuten. In diesem Fall führt der Schweratom-Effekt zu einem alternativen Reaktionspfad über einen langlebigeren Triplett-Zustand, in welchem die Fluoreszenz unterdrückt und die Rekombination ungünstig ist. Da BODIPY-Derivate mit Absorptionsmaxima bis ins Rotlicht hinein bekannt sind, kann davon ausgegangen werden, dass photolabile BODIPY-Schutzgruppen zukünftig eine große Rolle für biologische und therapeutische Anwendungen spielen werden.

Zuletzt soll in diesem Abschnitt auf die aktuellen Arbeiten von Schnermann *et al.* an Heptamethincyaninen eingegangen werden. Cyaninfarbstoffe werden vor allem in Techniken wie der Fluoreszenzmikroskopie verwendet und sind dafür bekannt, nach längerer Belichtung auszubleichen (Photobleaching). Mechanistische Studien haben gezeigt, dass dabei durch Photooxidation am konjugierten Doppelbindungssystem über die Zwischenstufe eines Dioxetans ein Bindungsbruch stattfindet.<sup>[38]</sup>



**Abb. 8** Mechanismus der Photolyse von Heptamethincyanin-Schutzgruppen mit selbstspaltendem Linker<sup>[39]</sup>

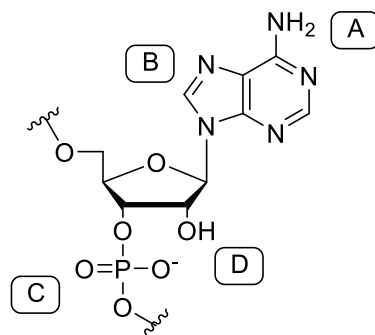
Cyanin-Derivat **21** besitzt an C4'-Position einen „self-immolative“ (sinngemäß selbst-spaltenden) Linker, der im Polymethin-Netzwerk stabil gebunden ist und außerdem über ein Carbamat die Abgangsgruppe trägt. Durch Belichtung mit Wellenlängen von 690 nm wird das Cyanin durch Photooxidation zu den zwei verschiedenen Aldehyden **22** und **23** fragmentiert. Der self-immolative Linker ist in diesen Fragmenten gegenüber Hydrolyse instabil und setzt zunächst das nukleophile Amin **26**, darauf durch intramolekulare Addition und Eliminierung schließlich 1,3-Dimethyl-2-imidazolidinon (DMI) zusammen mit der Abgangsgruppe frei. Man geht davon aus, dass die erhöhte Hydrolyseempfindlichkeit auf einen stärkeren Iminium-Charakter der C4'-N-Bindung in den Photooxidationsprodukten **22** und **23** zurückgeht.<sup>[39]</sup> Die Hydrolyse ist mit Halbwertszeiten im Minuten-Regime deutlich der ratenlimitierende Schritt.<sup>[40]</sup> Schnermann *et al.* konnten auf diese Weise bereits eindrucksvoll therapeutische Wirkstoffe wie 4-Hydroxycyclofen<sup>[40]</sup> und Duocarmycine<sup>[41]</sup> *in vivo* orts- und dosiskontrolliert mit Lichtwellenlängen von 780 nm freisetzen.

## 1.2 Photoaktivierbare Oligonukleotide und ihre Anwendungsgebiete

Lange Zeit galten Nukleinsäuren lediglich als zentrale Elemente beim Speichern und Verarbeiten des genetischen Codes. Die Palette funktionaler Oligonukleotide ist spätestens seit der Jahrtausendwende durch die Entdeckung von Riboswitches und Aptameren, sowie durch microRNA und siRNA um viele weitere regulatorisch wirkende Nukleinsäuren mit interessanten Anwendungsmöglichkeiten für photolabile Schutzgruppen bereichert wurden.<sup>[42]</sup>

### 1.2.1 Strategien zum Aufbau photoaktivierbarer Oligonukleotide

Die Wirkungsweise von Nukleinsäuren beruht in den meisten Fällen auf ihrer Fähigkeit zur Ausbildung einer stabilen Doppelhelix-Struktur, unter Umständen mit zusätzlichen komplexen Sekundärstrukturelementen wie z.B. Haarnadelstrukturen (hairpins). Maßgeblich für die Stabilität verantwortlich sind die Wasserstoffbrückenbindungen und der Energiegewinn durch Stapelung der Watson-Crick-Basenpaare. Daneben spielt für Nukleinsäure-Funktionen auch die Wechselwirkung mit Proteinen wie z.B. im RISC-Komplex (RNA-induced silencing complex) eine große Rolle, bei der es auch zu Interaktionen zwischen dem Protein und dem Zuckergerüst, sowie dem Phosphatrückgrat kommt.<sup>[43]</sup> Für den Aufbau photoaktivierbarer Oligonukleotide gibt es folglich verschiedene Anknüpfungspunkte für Modifikationen an den Monomer-Einheiten, die sich im Wesentlichen nach der Anwendung richten (Abbildung 9). Wird eine photolabile Schutzgruppe chemisch an der Watson-Crick-Basenseite (Abbildung 9A) angebracht, so wird durch sterische Repulsion die Stabilität der Doppelhelix lokal herabgesetzt und idealerweise formiert sich kein stabiler Doppelstrang mehr. Darüber hinaus werden durch Anbringen photolabiler Schutzgruppen (z.B. an Guanosin- $O^6$ , Uridin und Thyminid-  $O^4$ -Position) die Wasserstoffbrücken-Akzeptor- und Donoreigenschaften ausgetauscht, sodass der entsprechende Bindungspartner im Gegenstrang fehlt. Photolabile Modifikationen an der Watson-Crick-Basenseite werden spezifisch über chemische Festphasensynthese eingebaut.



**Abb. 9** Strukturausschnitt (Adenosin-Monomer) einer Ribonukleinsäure mit möglichen Modifikationsstellen an der Watson-Crick-Basenseite (A), der Nicht-Watson-Crick-Basenseite (B), dem Phosphat-Rückgrat (C) und der 2'-O-Position am Zuckergerüst (D)

Photolabile Schutzgruppen auf der Nicht-Watson-Crick-Basenseite destabilisieren den Duplex nicht, können ihn sogar durch die erhöhte Hydrophobizität auf dieser Seite stabilisieren. Man findet daher vor allem Anwendungen, die die Wechselwirkung mit Enzymen, beispielsweise von Ribonukleasen (RNAsen) temporär inhibieren sollen. Hier kann der Einbau entweder über chemische Festphasensynthese, aber auch, wie von Hocek *et al.* demonstriert, durch Polymerasen erfolgen.<sup>[44]</sup> Die Modifizierung des Phosphatrückgrats zählt zu den ältesten Strategien zur Herstellung photoaktivierbarer Oligonukleotide, insbesondere wenn die photolabile Schutzgruppe statistisch eingeführt wird. Der statistische Einbau erfolgt über eine Umsetzung der Nukleinsäure mit Diazo-Derivaten wie zum Beispiel dem Cumarin-Derivat Bhc-Diazo von Furuta *et al.*<sup>[45]</sup> Zwar können auf diese Weise ganze Plasmide temporär deaktiviert werden, allerdings ist das Verhältnis photolabiler Modifikationen pro Nukleotidanzahl sehr hoch, sodass hohe Belichtungs Dosen zur Freisetzung der photolabilen Schutzgruppen appliziert werden müssen. Auch der spezifische Einbau am Phosphatrückgrat ist über chemische Festphasensynthese möglich. In Studien von Tang *et al.* wurde für solche Oligonukleotide aber auch eine nicht vernachlässigbare Hydrolyseempfindlichkeit am Phosphatrückgrat im Doppelstrang nachgewiesen, die bei statistischer Modifizierung vermutlich zuvor nie ins Gewicht gefallen ist.<sup>[46]</sup> Daneben gibt es die Möglichkeit, einen Strangbruch über photospaltbare Linker<sup>[47]</sup> im Phosphatrückgrat oder durch photolabile Modifikationen am 5'-C zu induzieren.<sup>[48]</sup> In diesem Fall verliert das Oligonukleotid aber seine Aktivität nach Belichtung. Eine weitere mögliche Modifikationsstelle stellt schließlich im Falle von RNA die 2'-O-Gruppe dar. In der Praxis spielen photolabile Schutzgruppen an dieser Position u.a. als alternative orthogonale Schutzgruppe in der Festphasensynthese von RNA-Oligonukleotiden oder für die Regulation von Ribozymen eine größere Rolle.<sup>[49,50]</sup>

## **1.2.2 Anwendungen photoaktivierbarer Oligonukleotide**

### **1.2.2.1 Regulation der Genexpression**

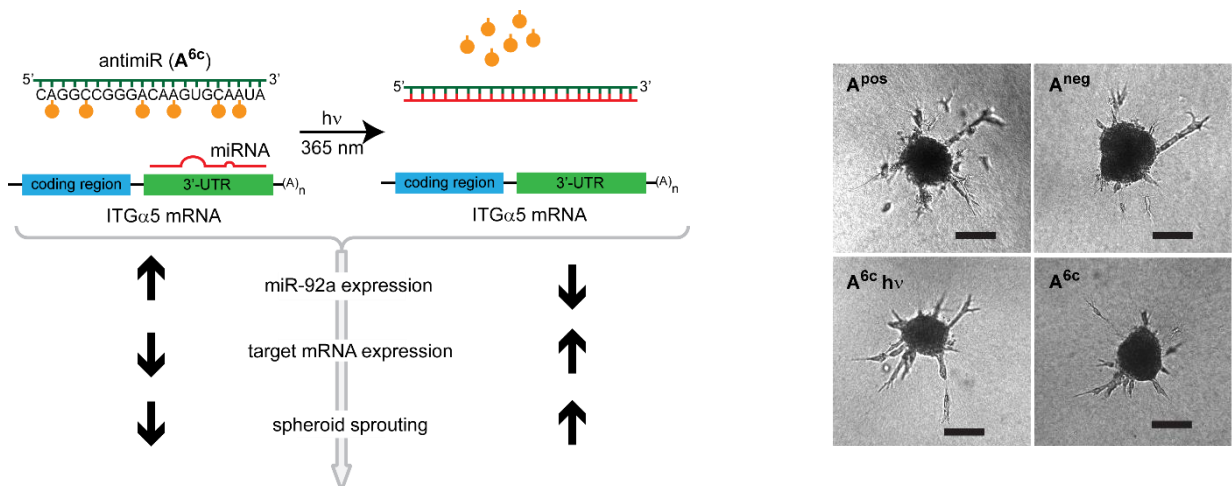
In den folgenden Abschnitten soll zunächst ein grober Überblick über die zahlreichen verschiedenen Anwendungsgebiete photoaktivierbarer Oligonukleotide gegeben werden. Einen großen Themenkomplex nimmt hierbei die Genexpression ein, die beginnend mit der Transkription von Genen zu verschiedenen RNAs (mRNA, tRNA, usw.) alle Transport- und Prozessierungsschritte der resultierenden Nukleinsäuren bis zur Translation bzw. der Synthese von Proteinen beschreibt. Die Regulation der Genexpression in Zellen stellt ein Zusammenspiel aus transkriptionellen Elementen wie Transkriptionsfaktoren und Chromatinregulatoren, sowie post-transkriptionellen Mechanismen wie der RNA-Interferenz, Regulation durch Riboswitches usw. dar. In vielen Krankheitsbildern wie etwa bei der Tumorentstehung ist die Genexpression in bestimmten Zellen fehlreguliert.<sup>[51]</sup> Es ist daher wünschenswert, in diese fehlregulierten Prozesse gezielt eingreifen zu können, ohne dabei

intakte Zellen zu beeinträchtigen. Antisense-Oligonukleotide sind DNA oder RNA-Stränge (oder Äquivalente wie PNA, LNA und Morpholinos) mit einer zum Zieloligonukleotid komplementären Sequenz. Zur Erhöhung der *in vivo* Stabilität enthalten Antisense-Oligonukleotide zusätzlich oft Thioate am Phosphatrückgrat, sowie in 2'-O-Position der Ribose Methoxy-Gruppen oder Fluoratome zur Erhöhung der Bindungsaffinität. Das Zielmolekül ist beispielsweise eine überregulierte, d.h. zu stark exprimierte mRNA. Durch das Binden des antisense-Oligonukleotids kann die mRNA nicht mehr translatiert werden und wird infolge dessen durch RNAsen abgebaut. Deiters *et al.* demonstrierten 2008 die Photoregulation der Luciferase Expression in Maus-Fibroblasten mittels Antisense-Oligonukleotiden (Phosphorthioat-DNA).<sup>[52]</sup> Durch den Einbau von drei NPOM-Schutzgruppen in das 18-mer Antisense-Oligonukleotid konnte die Aktivität der Luciferase auf 30% gesenkt und nach Belichten wieder vollständig aktiviert werden (Photomodulationsfaktor  $\approx 3,3$ ).

Den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin erhielten 2006 Andrew Z. Fire und Craig C. Mello für ihre Forschungen zur sogenannten RNA-Interferenz (RNAi). RNA-Interferenz ist ein Mechanismus der posttranskriptionellen Genregulation in Eukaryonten. Hierbei wird doppelsträngige RNA (dsRNA) im Cytoplasma zunächst durch das Enzym Dicer in kurzsträngige dsRNA-Fragmente mit zwei Nukleotiden 3'-Überhang gespalten. Entsteht die ursprüngliche doppelsträngige RNA einem endogenen Ursprung (nicht-kodierende Abschnitte transkribierter RNA), so wird diese als microRNA (miRNA) bezeichnet. Hat sie einen exogenen Ursprung (z.B. durch virale Vektoren), so bezeichnet man sie als short interfering RNA (siRNA). Kurzsträngige miRNA bzw. siRNA wird zunächst in einzelsträngige RNA entwunden, wobei jeweils der am 5'-Ende weniger stabil gepaarte RNA-Strang als guide strand in den sogenannten RNA-induced silencing complex (RISC) eingebaut wird.<sup>[53]</sup> Der verbleibende „passenger strand“ wird dagegen abgebaut. Danach wird die zum guide strand komplementäre Ziel-mRNA durch den RISC-Komplex gebunden. Im Falle von siRNA liegt eine vollständige Paarung vor, sodass die Ziel-mRNA durch die Ago2-Untereinheit des RISC gespalten und im Anschluss abgebaut wird. Im Gegensatz hierzu paart miRNA nur unvollständig und der RISC-Komplex bindet weniger selektiv an die 3'-untranslatierte Region (UTR) der Ziel-mRNA, wodurch die Bindung der mRNA an das Ribosom und somit die Translation unterbunden wird. Eine fehlerhafte Regulation der Genexpression durch miRNA und der für die Biogenese von miRNA verantwortlichen Enzyme spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Tumoren und anderer Krankheitsbilder.<sup>[54]</sup> In einer Studie von Heckel und Dimmeler *et al.* wurde die Regulation der Angiogenese (die Bildung neuer Blutgefäße) durch miR-92a in Endothelzellen untersucht.<sup>[55]</sup> Dabei wirkt miR-92a antiangiogen; d.h. wenn Gewebe infolge einer Ischämie nicht mehr ausreichend durchblutet wird, verhindert ein hohes Level an miR-92a eine Neubildung von Gefäßen.<sup>[56]</sup> Zur Verbesserung der Gefäßneubildung ist es notwendig, das Expressionslevel von miR-92a zu reduzieren. Hierzu wurden Antisense-

Oligonukleotide verwendet (die man in diesem Fall als AntimiRs bezeichnet), die mit insgesamt sechs photolabilen NPE-Schutzgruppen temporär inhibiert wurden (Abbildung 10).

Eine lokal begrenzte Aktivierung von AntimiRs mit Licht ist deswegen wünschenswert, weil eine einzelne miR in verschiedenen Geweben bzw. Organen unterschiedliche Aufgaben erfüllt und eine systemische Applikation entsprechende Nebenwirkungen mit sich führte. Das Ausmaß der Gefäßneubildung wurde anhand des Wachstums von Aussprossungen an Endothelzellen quantifiziert und erfolgreich eine Lichtregulation der Angiogenese erzielt. In einer weiterführenden Studie von Heckel und Dimmeler *et al.* wurde das Prinzip auf die Wundheilung von Haut am (diabetischen) Maus-Modell übertragen.<sup>[57]</sup> Hier wurde festgestellt, dass miR-92a in chronischen Wunden, wie sie bei Diabetikern häufig beobachtet werden, stark hochreguliert vorliegt. Eine Applikation von photolabil geschützter AntimiR-92a in Kombination mit einer lokalen Belichtung führte zu einer signifikant schnelleren und besseren Wundheilung.



**Abb. 10** Schema zur Lichtregulation von miR-92a mit Hilfe einer 6-fach photolabil geschützten AntimiR-92a. Vor Belichtung liegt miR-92a überreguliert vor, sodass die Ziel mRNA herunterreguliert und die Gefäßneubildung von Endothelzellen supprimiert wird. Nach Belichten bindet die AntimiR-92a an miR-92a und deaktiviert diese, sodass die Ziel mRNA hochreguliert und die Gefäßneubildung von Endothelzellen begünstigt wird.<sup>[55]</sup>

Ein Beispiel für den Einsatz photolabil geschützter siRNA ist beispielsweise die Unterdrückung der Eg5-Expression in HeLa-Zellen und GFP in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293T-Zellen).<sup>[58]</sup> Daneben gibt es funktionelle Oligonukleotide wie DNAzyme, welche mit Hilfe kationischer Kofaktoren die Spaltung von Nukleinsäuren analog zu Enzymen katalysieren können. Photoaktivierbare DNAzyme wurden z.B. von Dmochowski *et al.*<sup>[59]</sup>, Xiang *et al.*<sup>[60]</sup> und Deiters *et al.* entwickelt und u.a. für die Lichtregulation eines DsRed-Reportergens in HEK293T-Zellen eingesetzt<sup>[61]</sup>, auch wenn die Wirkung hierbei hauptsächlich einem antisense-Mechanismus zugeschrieben wurde.

Als letztes interessantes Beispiel für spezielle, regulatorisch wirkende und zugleich lichtsteuerbare Oligonukleotide werden im Folgenden Splice-switching Oligonukleotide (SSOs) erläutert. Im Rahmen der Genexpression schließt sich der sogenannte Spleiß-Vorgang

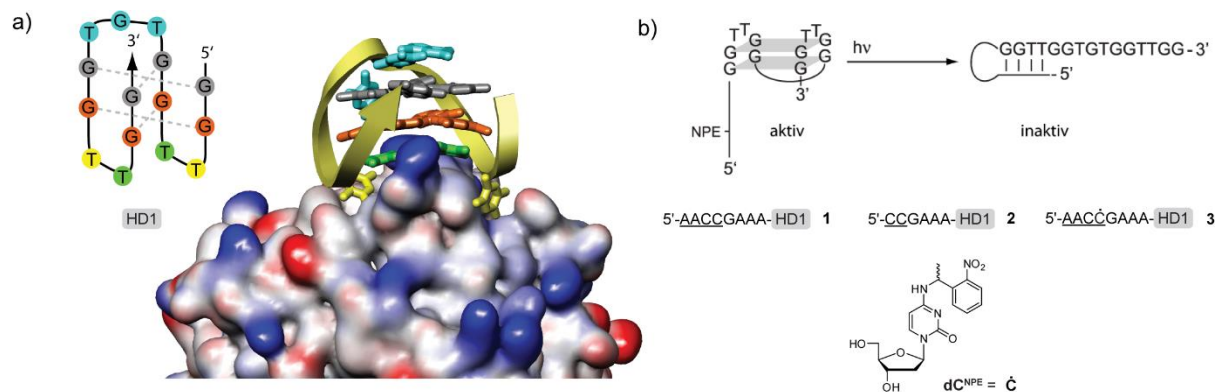
unmittelbar an die Transkription von DNA zur sogenannten prä-mRNA an. 1977 wurde von Sharp und Roberts entdeckt, dass in Eukaryonten Gene zur Synthese von Proteinen von nicht-kodierenden Abschnitten (Introns) unterbrochen werden. Introns können eine Länge von 50 bis 20000 Nukleotide besitzen und treten je nach Gen in unterschiedlicher Anzahl auf.<sup>[62]</sup> Darüber hinaus enthalten sie eine konservierte dinukleotidische Erkennungssequenz GU am 5'-Ende und AG am 3'-Ende, wodurch sie durch einen RNA-Protein-Komplex, das Spliceosom, erkannt und prozessiert werden können. Durch den Vorgang des Spleißens werden die Introns aus der prä-mRNA entfernt und die verbliebenen kodierenden Exons über die prominente, intermediäre Lasso-Struktur zur mRNA verknüpft. Ein großer Teil genetischer Erkrankungen, unter anderem Mukoviszidose oder Muskeldystrophie Duchenne, wird mit fehlerhaftem Spleißen assoziiert.<sup>[63–65]</sup> Splice-switching Oligonukleotide können an die prä-mRNA binden und die Wechselwirkung fehlerhafter Introns mit dem Spliceosom verhindern, sodass ein alternativer Spleißpfad bestritten und schließlich ein intaktes Protein exprimiert wird. Deiters *et al.* konnten u.a. im Zebrafisch-Modellsystem erfolgreich mittels NPOM-photolabil geschützten Linkern in einem SSO für das *sox31*-Gen die Epibolie (ein Entwicklungsschritt, bei dem sich Gewebe über das Dotter der Zebrafisch-Embryonen stülpt) an bzw. ausschalten.<sup>[65]</sup>

### 1.2.2.2 Aptamere zur Regulation der Proteinfunktion

Die Bezeichnung „Aptamer“ geht auf Arbeiten von Ellington und Szostak aus dem Jahre 1992 zurück<sup>[66]</sup> und setzt sich aus den Begriffen „aptus“ (lat. „passend“) und „meros“ (griech. „Teil“) zusammen. Aptamere sind künstliche DNA- oder RNA-Oligonukleotide (typischerweise in Längen zwischen 20 und 60 Nukleotiden), die mit hoher Selektivität und Affinität ( $K_{\text{diss.}} \approx$  nanomolar bis picomolar) Ionen, organische Verbindungen wie z.B. Naturstoffe<sup>[67]</sup>, Farbstoffe<sup>[66]</sup> und Proteine<sup>[68]</sup>, oder sogar gegen lebende Zellen<sup>[69]</sup> binden können. Aptamere falten in eine dreidimensionale Struktur mit charakteristischen Sekundärstrukturelementen (z.B. G-Quadruplexe, Haarnadelschleifen, usw.), über die das Zielmolekül gebunden wird. Auf dieser Grundlage bergen Aptamere ein hohes Potential in therapeutischen (z.B. Pegaptanib zur Behandlung von altersabhängiger Makula-Degeneration), sowie in analytischen und diagnostischen Anwendungen.<sup>[70]</sup> Üblicherweise werden Aptamere durch den SELEX-Prozess (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) identifiziert. Hierzu wird eine Bibliothek aus bis zu  $10^{15}$  verschiedenen Oligonukleotidsequenzen mit dem Zielmolekül *in vitro* versetzt. Sequenzen, die eine Bindung mit dem Zielmolekül eingehen, werden isoliert und über Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Mit dieser reduzierten Bibliothek wird die Selektion, Isolation und Amplifikation dann solange wiederholt, bis geeignete Sequenzen mit der nötigen Bindungsaffinität isoliert und sequenziert werden können.



Bereits im Jahre 1992 wurde durch Bock *et al.* mit dem HD1-Aptamer ein DNA-Oligonukleotid selektiert, welches spezifisch an humanes Thrombin bindet und auf diese Weise als Blutgerinnungshemmer (Antikoagulans) wirkt.<sup>[68]</sup> Es besteht im Minimalmotiv aus nur 15 DNA-Nukleotiden (5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'). Der hohe Anteil von Guanosinen legt bereits nahe, dass die Wirkung des HD1-Aptamers auf einer G-Quadruplex-Struktur beruhen könnte. Tatsächlich faltet HD1 unter physiologischen Bedingungen in einen intramolekularen, antiparallelen G-Quadruplex, dessen Konformation an die Form eines Stuhls erinnert.<sup>[71]</sup> Als G-Quadruplex gefaltet bindet HD1 an die Fibrinogen-Bindestelle (Exosite I) des Thrombins und inhibiert dieses dadurch (Abbildung 11). Die Blutgerinnung ist ein komplexer Prozess, der normalerweise nur am Ort verletzten Gewebes auftreten soll. Bei Blutgerinnungsstörungen drohen Verschlüsse von Blutgefäßen und Thrombosen, die beispielsweise zu Infarkten führen können. Eine ortsbegrenzte und dosiskontrollierte Behandlung von Blutgerinnungsstörungen und damit die Verwendung von Licht als Aktivator ist daher naheliegend. Mittels Einbau von nur einem einzigen NPP-photolabil geschützten Thymidin konnte durch Heckel *et al.* die Aktivität von HD1 mit Licht von „aus“ nach „an“ geschaltet werden.<sup>[72]</sup> Durch Verlängerung des 5'-Endes mit einer HD1-komplementären Teilsequenz (Inhibitorstrang) wurde das HD1-Aptamer in einer weiteren Studie um eine photoaktivierbare Antidot-Funktion ergänzt.<sup>[73]</sup>



**Abb. 11** (a) Kristallstruktur des HD1-Aptamers mit Bindung an Thrombin (PDB: 1HAO), die Oberfläche des Proteins ist der Ladung entsprechend eingefärbt (rot = negativ, blau = positiv)<sup>[71,74]</sup> (b) Sequenz des HD1-Aptamers mit NPE-photolabil geschütztem Inhibitorstrang und der Strukturformel des photolabil geschützten Nucleosid-Bausteins. Durch Belichten faltet der G-Quadruplex in eine inaktive Haarnadelstruktur um.

Während vor Belichten der Inhibitorstrang durch die NPE-Schutzgruppe deaktiviert ist, faltet nach Belichten der G-Quadruplex in eine intramolekulare Haarnadelstruktur um, welche dann nicht mehr blutgerinnungshemmend wirkt. Photoaktivierbares HD1 ist damit im therapeutischen Sinne prinzipiell dazu geeignet, eine gefährliche Überdosierung des Blutgerinnungshemmers mittels Lichtbestrahlung dosiskontrolliert entgegenzuwirken. Eine praktische Bedeutung hatte photoaktivierbares HD1 seit der Studie im Jahre 2006 jedoch noch nicht. Ein wichtiger Meilenstein für Anwendungen photoaktivierbarer Therapeutika in

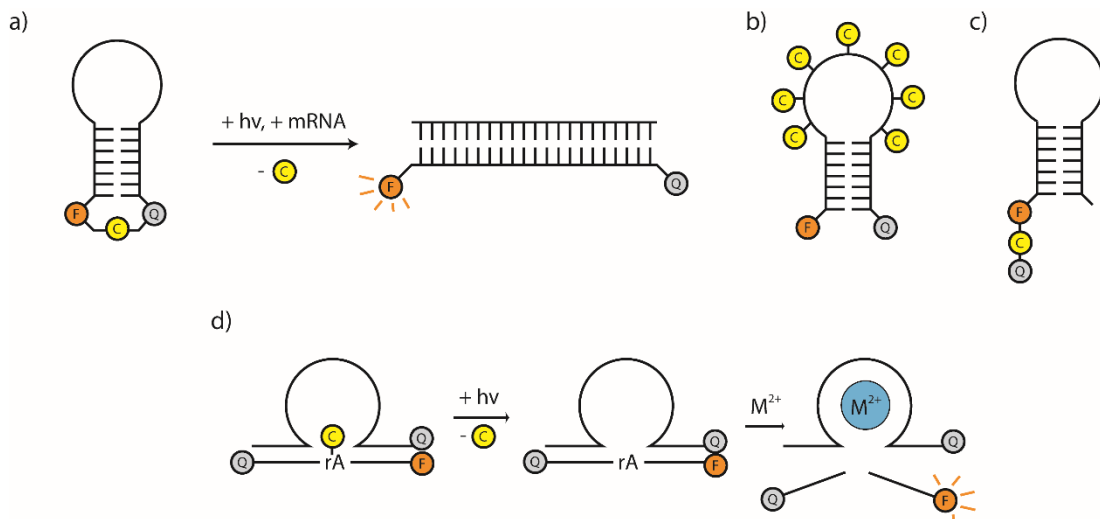
durchblutetem Gewebe ist die Entwicklung photolabiler Schutzgruppen mit Absorptionsmaxima im „therapeutischen Fenster“ (650 – 900 nm). Diese werden spätestens seit 2014 zwar intensiv publiziert (siehe Abschnitt 1.1.4), Derivate von bsp. BODIPY oder Heptamethincyaninen zur Photoaktivierung von Oligonukleotiden sind jedoch noch nicht bekannt bzw. Gegenstand aktuellster Forschung.

### 1.2.2.3 Photoaktivierbare Oligonukleotide als Fluoreszenzsonden

Zur Aufklärung komplexer biologischer Vorgänge bedarf es allgemein an Werkzeugen, die es ermöglichen, den Ort eines funktionellen Moleküls (beispielsweise mRNA, Proteine, Signalstoffe, usw.) innerhalb zellulärer Vorgänge zu beliebigen Zeitpunkten bestimmen zu können. Ein aktuelles Beispiel hierfür ist eine Arbeit von Schuman, Heckel *et al.*, in welcher die Hypothese untersucht wird, dass RNA-Interferenz zur Regulation der Genexpression nur dann effizient sein kann, wenn auch Mechanismen existieren, die eine räumliche Nähe von Ziel-mRNA und miRNA berücksichtigen.<sup>[75]</sup> Hierbei wurde u.a. durch kombinierte Verwendung einer Fluorophor-Quencher pre-miRNA-Sonde und photoaktivierbarem Glutamat ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung einer einzelnen Synapse (lichtgesteuerte Glutamat-Freisetzung), der Prozessierung von pre-miRNA-181a durch Dicer (Fluoreszenzanstieg am dendritischen Dornfortsatz durch Spaltung von Fluorophor und Quencher) und schließlich einer lokal reduzierten Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin Protein Kinase  $\alpha$  (CamKII $\alpha$ ) Expression nachgewiesen.

Ein Werkzeug für das Echtzeit-Verfolgen von RNA wird durch Hybridisierungs-Fluoreszenzsonden, sogenannte „molecular beacons“ bereitgestellt. Molecular beacons sind DNA-Oligonukleotide mit einer Stamm-Schleifen-Struktur, an deren 3'- und 5'-Ende jeweils ein Fluorophor und ein Quencher geknüpft sind. In der inaktiven Form sorgt die Stamm-Struktur für eine räumliche Nähe zwischen Fluorophor und Quencher, sodass die Fluoreszenz des Fluorophors durch Försterresonanzenergietransfer (FRET) zum Quencher ausgeschaltet wird. Liegt jedoch eine Ziel-DNA oder -RNA vor, die eine zur Schleife komplementäre Sequenz besitzt, so hybridisiert diese unter Aufbruch der Stamm-Region. Dabei wird der Fluorophor vom Quencher räumlich getrennt und Fluoreszenz kann detektiert werden. Wird ein molecular beacon in eine Zelle eingebracht, so würde dieser nach kurzer Zeit diffundieren und beispielsweise Ziel-mRNA in der ganzen Zelle anfärben. Eine bessere Orts- und Zeitauflösung erhält man, wenn der molecular beacon mit photolabilen Schutzgruppen versehen wird und beispielsweise durch einen Laser kontrolliert aktiviert werden kann. Photolabil geschützte molecular beacons wurden zunächst von Tan *et al.*<sup>[76]</sup> eingeführt (Abbildung 12a). Hierbei wurde das Fluorophor-Quencher-Paar über einen photolabilen Linker kovalent miteinander verknüpft. Allerdings wurde bereits vor Belichten im eigentlich inaktiven Zustand eine signifikante Hintergrundfluoreszenz festgestellt. Mit dem Ziel der Verbesserung der Aus-/An-

Schalteffizienz (Photomodulation) führten Heckel *et al.* multiple photolabile Schutzgruppen in die Schleifen-Sequenz eines molecular beacons ein und konnten damit das Transkript des nicht-regulierten Gens der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase in HEK 293-Zellen mit deutlich reduzierter Hintergrundfluoreszenz vor Belichtung visualisieren (Abbildung 12b).<sup>[77]</sup> In einer weiteren Studie entwickelten Heckel *et al.* einen molecular beacon, bei dem sich Fluorophor und Quencher beide am 5'-Ende der Sequenz befinden und über einen photolabilen Linker kovalent miteinander verknüpft sind (Abbildung 12c). Mit diesem Design konnte eine nochmals deutlich verbesserte Photomodulation beim Visualisieren von Balbiani ring (BR2) mRNA in *in vivo* erzielt werden. Allerdings muss für die Anwendung bedacht werden, dass im Gegensatz zu den vorigen Beispielen hier die mRNA bereits gebunden wird, bevor das Fluoreszenzsignal des molecular beacon mit Licht aktiviert wird.



**Abb. 12** (a) Schema eines photoaktivierbaren molecular beacons nach Tan *et al.*. Vor Belichtung wird die Fluoreszenz des Fluorophors gequencht, nach Belichten kann das Zieloligonukleotid binden, die Stamm-Schleifen-Struktur des molecular beacons öffnet sich und Fluoreszenz wird detektierbar.<sup>[76]</sup> (b) Molecular beacon mit multiplen photolabilen Schutzgruppen verhindert das Binden des Zieloligonukleotids vor Belichtung<sup>[77]</sup> (c) Alternatives Design für photoaktivierbare molecular beacons nach Heckel *et al.*<sup>[78]</sup> (d) *In vivo* Fluoreszenzsonden für Metall-Kationen basierend auf photoaktivierbaren DNAzymen<sup>[79]</sup>

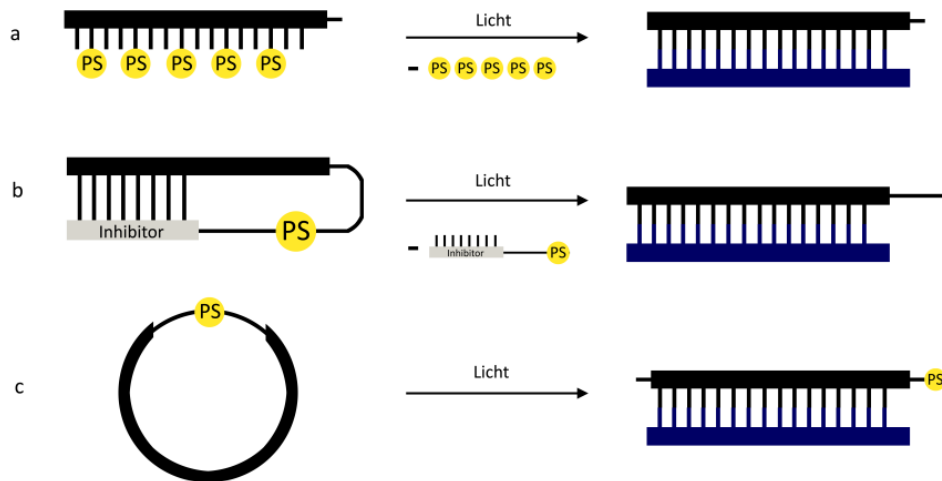
Als Alternative zu molecular beacons werden auch DNAzyme als Fluoreszenzsonden eingesetzt. DNAzyme benötigen für ihre Aktivität zumeist einen kationischen Co-Faktor. Während spezifische Sonden für biologisch relevante Kationen in Zellen im Wesentlichen nur für Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> und Cu<sup>2+/1+</sup> verfügbar sind, reicht die Kationen-Abhängigkeit von spezifisch selektierten DNAzymen über eine viel breitere Palette von Metallionen. Wird ein solches DNAzym nun mit einem RNA 5'-Fluorophor-3'-Quencher-Substrat verknüpft, so ergibt sich ein hoch-selektiver Biosensor zur *in vivo* Diagnostik von Metallionen. Ein Problem bei der *in vivo* Anwendung dieses Systems kann der enzymatische Abbau des RNA-Substrats durch

Endonukleasen sein. Lu *et al.* führten deswegen an der Substrat-Schnittstelle eine 2'-O-photolabile Nitrobenzylmodifikation ein (Abbildung 12d).<sup>[79]</sup> Auf diese Weise gelang die spezifische Detektion von Zn<sup>2+</sup>-(8-17 DNAzym) und Pb<sup>2+</sup>-Ionen (GR-5 DNAzym) in HeLa-Zellen.

### 1.2.3 Strategien zur Verbesserung der Photomodulationseffizienz (An-/Aus-Schaltbarkeit)

Wie in den vorhergehenden Abschnitten gezeigt, werden photoaktivierbare Oligonukleotide in verschiedenen Forschungsgebieten eingesetzt. Dabei ist es wünschenswert, dass durch den Einbau einer einzigen photolabilen Schutzgruppe zum einen das Oligonukleotid vollständig inhibiert, zum anderen dadurch der zu regulierende oder zu untersuchende Prozess vollständig aktiviert oder inaktiviert vorliegt. Auch wenn durch Verwendung photolabiler Schutzgruppen prinzipiell ein 100%-iges An-/Aus- bzw. Aus-/An-Schaltverhalten durch Belichtung erreicht werden kann, wird in der Praxis in der Regel eine Restaktivität des geschützten Oligonukleotids beobachtet. Dies gilt insbesondere für photoaktivierbare Antisense-Oligonukleotide, bei denen die Wirkung nicht auf einer „Schlüssel“-Wechselwirkung eines bestimmten Nukleotids, sondern auf der Ausbildung einer stabilen Doppelhelix-Struktur basiert. In der Regel ist die thermodynamische Triebkraft (hauptsächlich gegeben durch den Enthalpiegewinn durch die Bildung der Wasserstoffbrückenbindungen und die Stapelung der Nucleobasen) groß genug, um die lokale Störung durch eine photolabil modifizierte Nucleobase zu kompensieren. Aus diesem Grund haben sich in den letzten Jahren neue Architekturen für die Photoaktivierung von Oligonukleotiden entwickelt. Ein Überblick dazu ist in Abbildung 13 zusammengefasst.

Ein naheliegender Ansatz für die Verbesserung des An-/Aus-Schaltverhaltens (Photomodulation) ist der Einbau multipler photolabiler Schutzgruppen innerhalb einer bestimmten Oligonukleotid-Sequenz (Abbildung 13a). Ein Beispiel aus der Forschung der Arbeitsgruppe Heckel zeigt dies eindrucksvoll. So waren für das vollständige Deaktivieren der AntimiR-92a zur Lichtregulation der Angiogenese sechs photolabile Schutzgruppen notwendig, bei einer Oligonukleotid-Länge von „nur“ 22 Nucleotiden.<sup>[55]</sup> Das entspricht einer photolabilen Modifikation pro 3-4 Basen, einem Verhältnis das sogar deutlich ungünstiger ist als in Beispielen mit statistischen photolabilen Modifikationen direkt an mRNA<sup>[45]</sup> (ca. eine photolabile Modifikation pro 35 Basen).



**Abb. 13** Ansätze zur Verbesserung des An-/Aus-Schaltverhaltens photoaktivierbarer Oligonukleotide durch (a) Einbau multipler photolabiler Schutzgruppen, (b) Verknüpfung eines teilkomplementären Inhibitorstrangs über einen kovalenten, photolabilen Linker oder (c) End-zu-End-Zyklisierung des Oligonukleotids mit einem photolabilen Linker.

Auch in Arbeiten von Deiters *et al.* war der Einbau von drei bzw. vier photolabil geschützten Thymidin-Derivaten auf eine Sequenzlänge von 18 Nukleotiden notwendig, um die Luciferase-Expression effizient mit einer antisense-DNA zu schalten.<sup>[52]</sup> Obschon durch Einbau multipler photolabiler Schutzgruppen eine vollständige Deaktivierung von Oligonukleotiden im geschützten Zustand erreicht werden kann, liegt der große Nachteil dieser Strategie vor allem auf der Anwendungsseite: Je mehr photolabile Schutzgruppen eingebaut werden, desto höher muss die Bestrahlungsdosis zur Freisetzung der Schutzgruppen sein. Dies ist gleichbedeutend mit entweder einer hohen Lichtintensität oder einer langen Belichtungsdauer. Dabei müssen zum einen ein hohes Risiko für photoinduzierte Schäden am System, zum anderen der Verlust der hohen Zeitauflösung gerade bei Beobachtung schneller Prozesse in Kauf genommen werden. Eine Weiterentwicklung auf diesem Gebiet stellen daher Antisense-Oligonukleotide mit einem teilkomplementären Inhibitorstrang dar, wobei letzterer über einen photolabilen Linker an die antisense-Sequenz kovalent verknüpft ist (Abbildung 13b). Der Ursprung dieses Ansatzes geht auf eine frühe Arbeit von Ordoukhanian und Taylor aus dem Jahre 1995 zurück.<sup>[47]</sup> Darin wird bereits von der lichtaktivierten Hybridisierung (ohne Regulierung) eines antisense-Oligonukleotids mit Inhibitorstrang an einen viralen M13-Einzelstrang berichtet. Die Belichtung des Konstrukts führte zu einer neunfach stärkeren Bindung zwischen antisense-Oligonukleotid und M13. Die Grundidee hierbei ist die Folgende: Im unbelichteten Zustand hybridisiert ein teilkomplementärer Gegenstrang (Inhibitorstrang) intramolekular mit dem antisense-Oligonukleotid. Da intramolekulare Wechselwirkungen gegenüber intermolekularen Wechselwirkungen entropisch begünstigt sind, erfolgt keine Hybridisierung mit dem Ziel-Oligonukleotid, wodurch letzteres im aktiven Zustand bleibt. Nach Belichten wird die kovalente Verknüpfung zwischen antisense-Oligonukleotid und Inhibitor-Strang durch Photolyse

gebrochen. Die vormals intramolekulare Hybridisierung zwischen antisense- und Inhibitorstrang wird dadurch intermolekular und es bildet sich in der Folge der thermodynamisch günstigere, vollkomplementäre Duplex zwischen antisense- und Ziel-Oligonukleotid aus. Dies entspricht einer Deaktivierung des Ziel-Oligonukleotids. Der große Vorteil dieser Strategie ist, dass mit nur einer photolabilen Modifikation theoretisch eine vollständige Deaktivierung des zu schützenden Oligonukleotids erfolgen kann. Dies demonstrierten unter anderem Dmochowski *et al.* an Hand der Inhibierung von *c-myc* mRNA in K562-Zellen<sup>[80]</sup> und Chen *et al.* mittels antisense-Morpholino-Oligonukleotiden zur Regulation verschiedener Gene in Zebrafisch-Embryonen.<sup>[81]</sup> Im Gegensatz zur Verwendung multipler photolabiler Schutzgruppen bleibt jedoch nach Belichten der Inhibitor zunächst gebunden und muss erst durch das Ziel-Oligonukleotid verdrängt werden. Dies hat zwei Konsequenzen, die sich u.a. in den Literaturbeispielen von Dmochowski und Chen widerspiegeln: Zum einen ist die Photoaktivierungsrate in diesem Fall zusätzlich abhängig von der Verdrängungsreaktion zwischen Inhibitor und Ziel-Oligonukleotid, was die Zeitauflösung mindert. Zum anderen wird durch die Konkurrenz von Inhibitor und Ziel-Strang die Länge des Inhibitorstrangs ein kritischer Parameter für die Photomodulationseffizienz. Ist der Inhibitorstrang zu kurz, so wird er bereits vor Belichten durch das Ziel-Oligonukleotid verdrängt und man beobachtet hohe Restaktivität im geschützten Zustand. Ist der Inhibitorstrang dagegen zu lang, so wird er nach dem Belichten nur teilweise verdrängt und man beobachtet keine vollständige Aktivierung. In der Regel werden deswegen Faktoren wie die Länge des Inhibitorstrangs sowie die Beschaffenheit des photolabilen Linkers durchgetestet und in Hinblick auf den größten dynamischen Schaltbereich („dynamic range“) untersucht. In systematischen Untersuchungen von Chen *et al.* ergab sich außerdem, dass eine Optimierung der Inhibitor-Länge *in vitro* nicht mit den *in vivo* Ergebnissen übereinstimmen muss, was unter anderem der zellulären Wechselwirkung von antisense-Morpholinos (mit Proteinen, RNA-Strukturen, usw.) zugeschrieben wird. Auch unterscheiden sich Salzkonzentrationen unter *in vitro*- und *in vivo*-Bedingungen erheblich. Nichtsdestotrotz zeigen Chen *et al.* in ihrer Studie, dass durch systematische thermodynamische Untersuchung empirische Regeln für das Design eines antisense-Morpholinos mit photoaktivierbarem Inhibitorstrang in Zebrafisch-Embryonen abgeleitet werden können.

Mit dem Wunsch nach einem universelleren und zugleich effizienten Ansatz für photoaktivierbare Oligonukleotide wurde als eine weitere Strategie die End-zu-End-Zyklisierung von Oligonukleotiden entwickelt (Abbildung 13c). Hierzu werden das 5'- und das 3'-Ende eines antisense-Oligonukleotids über einen photolabilen Linker kovalent miteinander verknüpft. Ein wichtiger Begriff in diesem Zusammenhang ist die sogenannte Persistenzlänge. Betrachtet man eine Polymer-Kette, beispielsweise ein Oligonukleotid, so wird diese Polymer-Kette mit zunehmender Länge von einer geradlinigen in eine Knäuelstruktur übergehen. Legt

man eine Tangente an verschiedenen Positionen der Polymer-Kette an, so werden die dazugehörigen Richtungsvektoren zu Beginn der Polymer-Kette noch in ähnliche Richtungen zeigen, d.h. sie sind korreliert. Addiert man jedoch die Tangentenvektoren entlang des ganzen Polymers auf, so wird der Betrag des resultierenden Richtungsvektors zunehmend kleiner bis er schließlich verschwindet. Jene Länge, bei der die Richtung der Polymer-Kette zwischen Anfang und Ende nicht mehr korreliert ist, bezeichnet man als Persistenzlänge. In anderen Worten ausgedrückt beschreibt die Persistenzlänge die Steifigkeit eines Polymers. Während einzelsträngige DNA eine Persistenzlänge von nur wenigen Nanometern besitzt, beträgt die Persistenzlänge doppelsträngiger DNA ca. 50 nm. Anschaulich betrachtet verhalten sich doppelsträngige und einzelsträngige DNA zueinander wie rohe und gekochte Spaghetti. Schon verhältnismäßig kleine Plasmide überschreiten die Persistenzlänge von doppelsträngiger DNA um ein Vielfaches (1 kbp entspricht  $\approx 340$  nm), weswegen es auch nicht verwundert, dass Plasmide stabile Doppelhelixstrukturen ausbilden. Wird ein einzelsträngiges Oligonukleotid dagegen mit ausreichend kleinen Ringgrößen End-zu-End-zyklisiert, so wird die Duplexbildung aufgrund der resultierenden Ringspannung unterdrückt.

Die End-zu-End-Zyklisierung von Oligonukleotiden kann auf verschiedene Arten, sowohl chemisch als auch enzymatisch erfolgen. So verwendeten Dmochowski *et al.* Ligasen (CircLigase) für die enzymatische Zyklisierung eines photoaktivierbaren DNAzymes.<sup>[59]</sup> Tang *et al.* führten eine postsynthetische, peptidische Kupplungsreaktion von 5'-COOH- und 3'-NH<sub>2</sub>-modifizierten antisense-DNA-Oligonukleotiden mit Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDCI) durch.<sup>[82]</sup> Innerhalb der Sequenz befand sich außerdem ein nitrobenzylischer, photolabiler Linker. In der ursprünglichen Studie von 2010 wurde mit zyklisierten Antisense-Oligonukleotiden zunächst der Abbau durch RNase H, der nur im hybridisierten Zustand erfolgt, photoreguliert. Dabei wurden sowohl die Länge der Ziel-RNA, als auch die Ringgröße variiert, woraus sich in dieser speziellen Studie bereits folgende, qualitative Tendenzen ergaben: Wird die Länge der linearen Ziel-RNA konstant gehalten, dafür die Ringgröße des zyklisierten Oligonukleotids erhöht, so nimmt die Restaktivität des RNase-Abbaus im geschützten Zustand zu. Wird die Länge der linearen Ziel-RNA verkürzt und die Ringgröße des antisense-Oligonukleotids konstant gehalten, so erhöht dies ebenfalls die Hintergrundaktivität. Je kleiner die Ringgröße im Verhältnis zur Ziel RNA, desto kleiner ist die Aktivität nach Belichten. Die beste Photomodulation (von vollständig inaktiv auf 28% Aktivität) wurde in dieser Studie erhalten bei Kombination einer 40-mer RNA mit einem zyklisierten 20-mer antisense-Oligonukleotid. Einen großen Schritt weiter brachten Chen *et al.* die erfolgreiche Anwendung photoaktivierbarer, zyklisierter antisense-Morpholinos in Zebrafischen durch die Photoregulation von *ntla*, einem T-Box Transkriptionsfaktor, und *ptf1a*, einem wichtigen Transkriptionsfaktor für die Entwicklung des Pankreas.<sup>[83]</sup> Die End-zu-End-Zyklisierung des antisense-Morpholinos erfolgte hier mit guten Ausbeuten über eine postsynthetische Reaktion

zwischen einem Thiol und einem Chloracetamid-Rest. In dieser Studie wurde ebenfalls der Effekt der Ringgröße auf die Restaktivität im geschützten Zustand und auf die Aktivität im belichteten Zustand untersucht. Je kleiner der Ring, desto weniger (bei weniger als 21 Nukleotiden keine) Restaktivität aber auch desto weniger „knock-down“ Phänotyp konnte nach Belichtung der Zebrafische beobachtet werden. Mit zunehmender Ringgröße dagegen stieg die Restaktivität und wegen der höheren Komplementarität zugleich die Aktivität nach Belichtung an. Als guter Kompromiss zwischen Restaktivität und Aktivität nach Belichtung wurde in dieser Studie eine Ringgröße von 25 Nukleotiden gewählt.

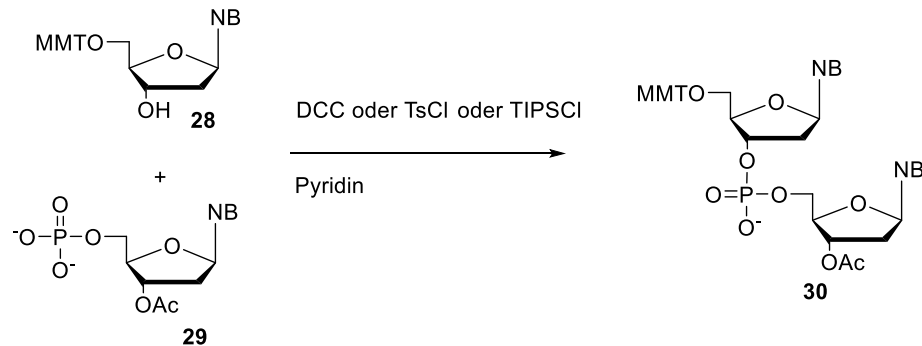
Im Bearbeitungszeitraum der vorliegenden Doktorarbeit wurde kürzlich eine weitere elegante Strategie für photoaktivierbare, zyklisierte Antisense-Oligonukleotide von Dmochowski *et al.* vorgestellt. Hierbei wurde ein photolabiler Rutheniumbipyridin-Komplex mit zwei Alkin-modifizierten Pyridinliganden verwendet. Durch Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC) wurde der Komplex mit einem antisense-Morpholino zur Reaktion gebracht, der sowohl am 3'-, als auch am 5'-Ende mit einer Azid-Gruppe versehen war. Die daraus resultierenden zyklisierten 25-mer Morpholinos konnten erfolgreich zur lichtgesteuerten Entwicklung verschiedener Zebrafisch-Phänotypen genutzt werden.<sup>[84]</sup>

### 1.3 Festphasensynthese von (modifizierten) DNA- und RNA-Oligonukleotiden

Die Funktionsweise komplexer, zellulärer Mechanismen kann heute nicht zuletzt deswegen aufgeklärt werden, weil es chemische Methoden gibt, die es erlauben, Nucleinsäuren mit nahezu beliebigen Modifikationen (Reportermolekülen, Affinitätsmarkern, usw.) auszustatten und dadurch beobachtbar, sowie regulierbar zu machen. Da Nucleinsäuren in der Regel Polymere sind, zusammengesetzt aus jeweils vier verschiedenen Nucleosidbausteinen, bietet sich für die chemische Synthese von DNA- und RNA-Derivaten ein iterativer Syntheszyklus an. Jeder Reaktionsschritt innerhalb eines Zyklus muss dabei außerordentlich effizient sein. Wird beispielsweise jedes neue Nucleosid mit einer Ausbeute von 90% an die wachsende Nucleotidkette angefügt, so wäre ein 30-mer schon nur noch mit einer Gesamtausbeute von etwa 4% darstellbar. Für die Synthese von 100-mer Oligonucleotiden sind dementsprechend extrem hohe Kupplungseffizienzen von über 99% notwendig. Die Schlüsselkomponente beim Aufbau von Nucleinsäure-Oligonucleotiden ist die internucleosidische 3'-5'-Phosphodiester-Verknüpfung. Dieser spezifischen Verknüpfung steht zunächst eine Vielzahl potentiell konkurrierender Funktionalitäten gegenüber. So befinden sich am Zucker-Baustein eines Nucleosids nucleophile 2'-,3'- und 5'-OH-Gruppen. Die Nucleobasen von Adenosin, Cytidin und Guanosen besitzen darüber hinaus die nucleophilen, exozyklischen Amino-Gruppen. Diese müssen mit geeigneten, orthogonalen (meist säure-, basen- und Fluorid-labilen) Schutzgruppen versehen werden.

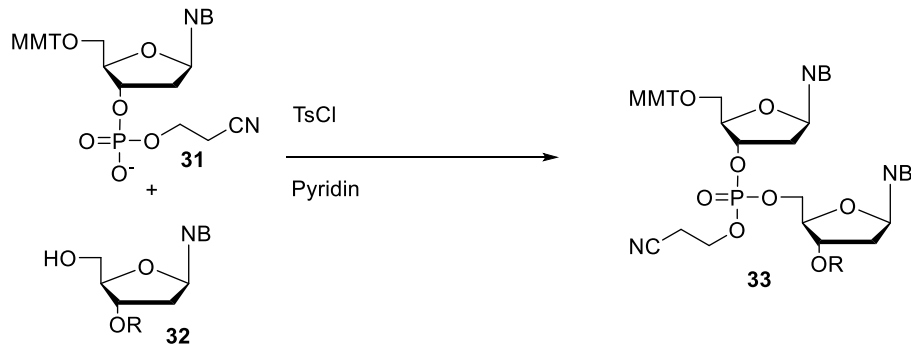


Pionierarbeiten auf dem Gebiet der Oligonukleotidsynthese wurden zunächst in den späten 1950ern von Khorana *et al.* durch die Entwicklung der Phosphodiester-Methode geleistet (Abbildung 14).<sup>[85]</sup>



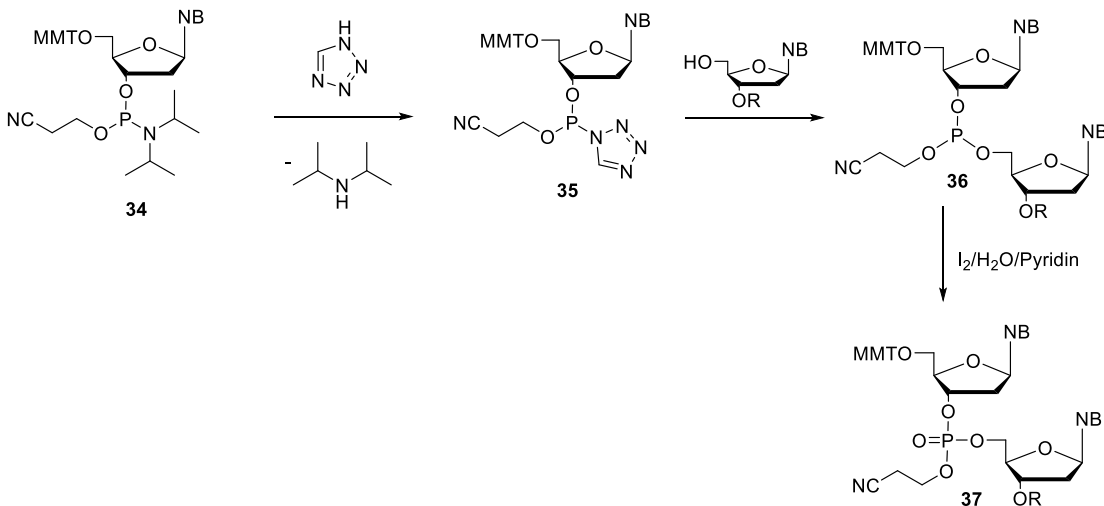
**Abb. 14** Beispiel für die Kupplung zweier Nucleoside mittels Phosphodiester-Methode<sup>[85]</sup>

Hierbei wird ein 3'-O-geschütztes Nucleosid zunächst am 5'-O-Phosphat aktiviert, wofür z.B. DCC, TsCl oder TIPSCl (Triisopropylbenzylsulfonylchlorid) verwendet wird. Im darauffolgenden Schritt greift ein 5'-O-geschütztes Nucleosid an den aktivierten Phosphatmonoester an und es entsteht ein dinucleosidischer Phosphodiester. Die Syntheserichtung verläuft hierbei von 5'- in 3'-Richtung. Der große Nachteil der Phosphodiester-Methode ist das Auftreten von Reaktionsnebenprodukten, wie z.B. Pyrophosphaten und verzweigten Oligonucleotiden, sowie eine aufgrund des geladenen Phosphats komplizierte Aufreinigung über beispielsweise Anionenaustauschchromatographie. Bei der Phosphotriester-Methode nach Letsinger *et al.* wird das 5'-O-Phosphat mit einer zusätzlichen  $\beta$ -Cyanoethyl-Schutzgruppe (CEO) versehen und damit vor einer weiteren Aktivierung durch Arylsulfonylchloride geschützt.<sup>[86]</sup> Nebenreaktionen, die bei der Phosphodiester-Methode zur Bildung von Pyrophosphaten oder von Verzweigungen führten, wurden mit dieser einfachen Modifikation unterbunden. Am Ende der Oligonucleotidsynthese werden sämtliche CEO-Schutzgruppen in einem Schritt durch Eliminierungsreaktion mit einer milden Base entfernt. Die dinucleosidische Kupplung findet bei der Phosphotriester-Methode von 3'- in 5'-Richtung statt. Typische Kupplungsausbeuten (beim Einsatz in Festphasensynthesen) liegen zwischen 97 und 98%, wodurch bereits Oligonucleotide bis zu einer Länge von 40 Nucleotiden in brauchbaren Ausbeuten dargestellt werden können. Verluste entstehen hauptsächlich durch Sulfonierung der ungeschützten 5'-OH-Gruppe, sowie durch Phosphorylierung von Guanosinen in O<sup>6</sup>-Position.<sup>[87]</sup>



**Abb. 15** Beispiel für die Kupplung zweier Nucleoside mittels Phosphotriester-Methode<sup>[85]</sup>

Letsinger *et al.* berichteten bereits 1975 vom Einsatz reaktiver Phosphor(III)-Spezies zur Kupplung von Nucleosiden,<sup>[88]</sup> wobei die dazu notwendigen 3'-O-Chlorphosphit-Nucleoside aufgrund der Sauerstoff- und Hydrolyseempfindlichkeit schwierig zu handhaben waren. Zu Beginn der 1980er wurde darauf aufbauend schließlich von Caruthers und Beaucage die heute standardmäßig verwendete Phosphitriester- bzw. die Phosphoramidit-Methode entwickelt.<sup>[89]</sup>

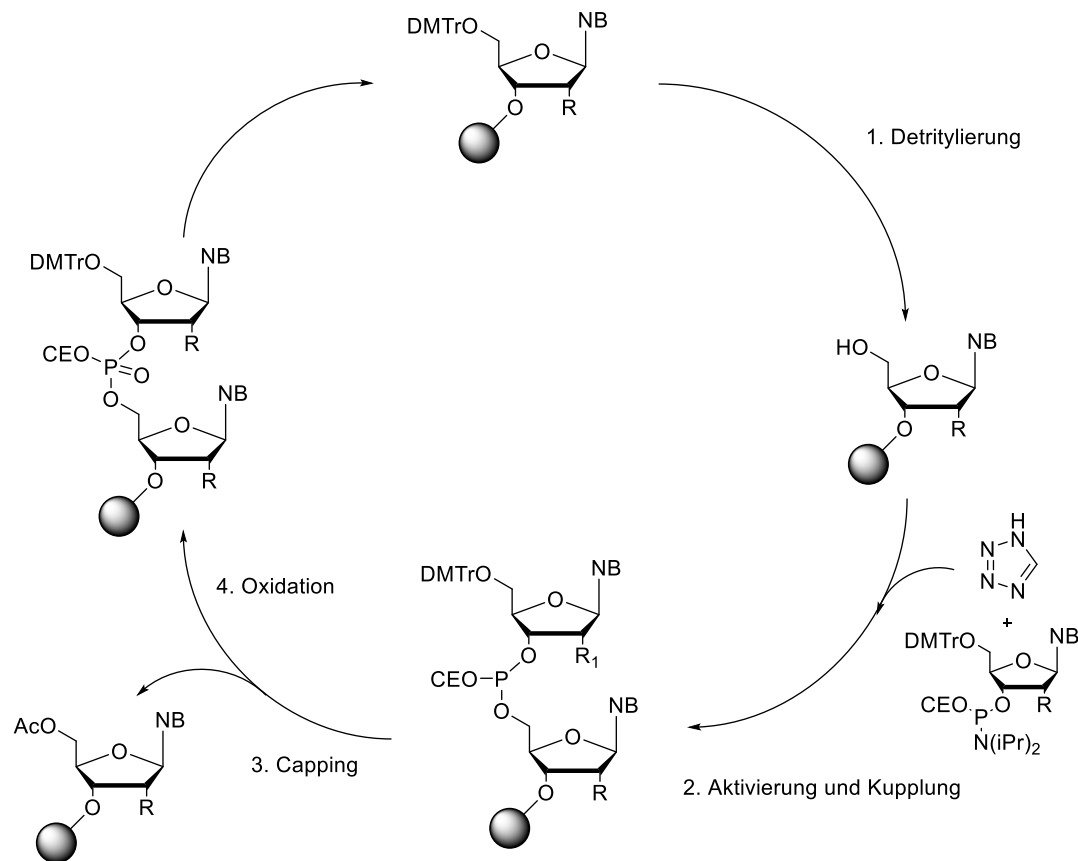


**Abb. 16** Beispiel für die Kupplung zweier Nucleoside mittels Phosphoramidit-Methode mit anschließender Oxidation<sup>[89]</sup>

Phosphoramidit-Nucleoside besitzen eine *N,N*-Diisopropylamino-Abgangsgruppe, die jedoch zunächst aktiviert werden muss. Hierzu werden üblicherweise schwach saure Tetrazol-Derivate verwendet (Abbildung 16). Das aktivierte Phosphoramidit wird dann mit der 5'-OH-Gruppe des zweiten Nucleosids zur Reaktion gebracht. Das resultierende dinucleosidische Phosphit muss daraufhin zum Phosphotriester oxidiert werden, damit bei der darauffolgenden Kupplungen keine Nebenreaktionen am Phosphor(III) auftreten. Die Kupplungsausbeuten liegen bei der Phosphoramiditmethode (bei Einsatz in Festphasensynthesen) bei über 99%, sodass auch 100-mer Oligonucleotide mit guten Ausbeuten synthetisiert werden können. Die

einzig nennenswerte Nebenreaktion, die Phosphitylierung an  $O^6$ -Position von Guanosinen, kann durch Einsatz von Säureanhydriden und *N*-Methylimidazol rückgängig gemacht werden.<sup>[87]</sup>

Ein wirklicher Durchbruch in der chemischen Synthese von Oligonukleotiden ist nicht zuletzt durch die Kombination der Phosphoramidit-Methode mit der Festphasensynthese gelungen. Als feste Phase kommt üblicherweise ein Merrifield-Harz aus Polystyrol oder Silikat-basiertes CPG (controlled pore glass) zum Einsatz. Über einen langkettigen Abstandhalter (Spacer) und einen Succinyl-Linker wird das erste Nukleosid einer Oligonukleotid-Sequenz kovalent auf der festen Phase (hier CPG) angebracht. Anschließend werden durch eine Folge sich wiederholender Reaktionsschritte die weiteren Nukleosid-Bausteine nacheinander hinzugefügt (Abbildung 17).



**Abb. 17** Schema der Phosphoramidit-Festphasensynthese von DNA- und RNA- (R = OTBDMS) Oligonukleotiden

Ein Zyklus beginnt dabei mit der Abspaltung der säurelabilen 5'-O-DMTr-Schutzgruppe mit z.B. Dichloressigsäure in DCM (Detritylierung). Das dabei freigesetzte Dimethoxytrityl-Kation weist eine charakteristische orangene Farbe auf und kann spektroskopisch oder konduktometrisch quantifiziert und zur Bestimmung der Kupplungseffizienz des

vorangegangenen Syntheszyklus genutzt werden. Daraufhin wird das neu zu verknüpfende Nukleosid-Phosphoramidit mit dem Aktivator (üblicherweise ein Tetrazol-Derivat) vorgemischt und dann mit dem freien 5'-OH des Nukleosids auf der festen Phase verknüpft. Um die Entstehung fehlerhafter Sequenzen zu verhindern, werden alle verbleibenden, nicht reagierten, 5'-OH-Gruppen im darauffolgenden Capping-Schritt mit Essigsäureanhydrid und *N*-Methylimidazol acyliert und somit deaktiviert. Der Zyklus endet mit der Oxidation des dreiwertigen Phosphits zum fünfwertigen Phosphat mittels Iod in wässrigem Pyridin.

Der Syntheszyklus wird nun mit dem nächsten Phosphoramidit-Nukleosid solange wiederholt, bis die volle Sequenz synthetisiert wurde. Im Anschluss muss die fertige Oligonukleotidkette von der festen Phase getrennt werden. Hierzu wird der Succinyl-Linker mit Hilfe von 32%-iger Ammoniaklösung hydrolysiert. Bei diesem Schritt werden zugleich die exozyklischen Amino-Schutzgruppen der Nukleobasen, sowie die CEO-Schutzgruppen am Phosphatrückgrat entfernt. Das Abspaltungsprodukt der CEO-Schutzgruppe ist Acrylnitril, welches in wässrig basischem Milieu zum Teil an die N<sup>3</sup>-Position von Thymin addiert wird. Um diese Nebenreaktion zu verhindern, sollte der Ammoniakabspaltung ein Waschschriff mit Basen wie Diethylamin (DEA) oder Triethylamin vorausgehen.<sup>[90]</sup> Im Falle von RNA muss nach der Abspaltung von der Festphase zunächst noch die persistente 2'-O-Schutzgruppe (meist Silyl-Schutzgruppen) abgespalten werden, standardmäßig erfolgt dies durch Fluorid-Reagenzien (z.B. Triethylamintrihydrofluorid mit *N*-Methylpyrrolidinon). Wurde die Festphasensynthese unter Erhalt der endständigen 5'-O-DMTr-Schutzgruppe durchgeführt (DMTr „ON“-Modus), so kann nun eine einfache Aufreinigung des Vollängenprodukt durch RP-HPLC erfolgen. Hierbei sorgt die hydrophobe Trityl-Schutzgruppe zu einer deutlich späteren Elution des Vollängen-Oligonukleotids im Vergleich zu den noch vorhandenen acetylierten Abbruchsequenzen. Weitere typische Aufreinigungsmethoden sind z.B. Anionenaustauschchromatographie und Polyacryl-Gelelektrophorese (PAGE).

Häufig dient die Festphasensynthese von Oligonukleotiden dem gezielten Einbau modifizierter Nukleoside. Viele Modifikationen wie Fluoreszenzfarbstoffe und unter Umständen auch photolabile Schutzgruppen reagieren empfindlich gegenüber den Standardabspaltungsbedingungen der Festphasensynthesen (basische Abspaltung über 24 Stunden oder starkes Erwärmen auf 60 °C). Hierfür wurden alternative persistente Schutzgruppen (z.B. Phenoxyacetyl-Schutzgruppen wie iPrPac in der sogenannten „UltraMILD“<sup>®</sup>-Strategie) für die exozyklischen Amine entwickelt. Diese erlauben eine vollständige Abspaltung innerhalb von 2 Stunden bei Raumtemperatur.

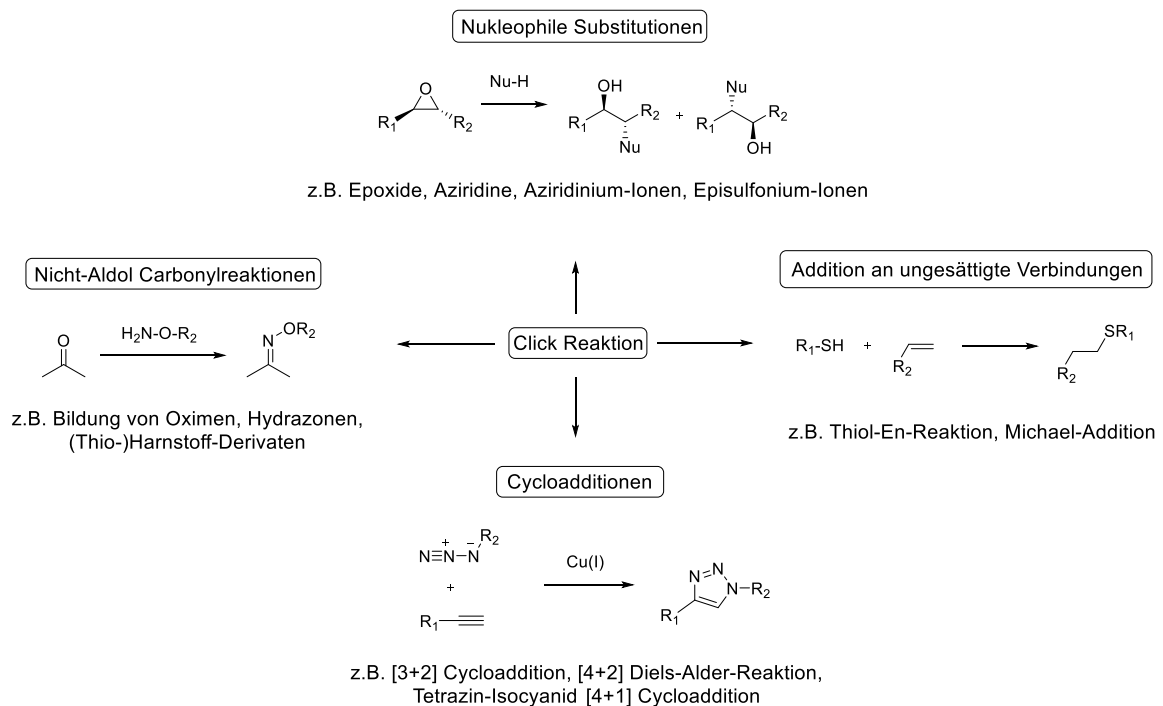
Modifikationen können allerdings auch postsynthetisch an das Oligonukleotid angefügt werden. Hierzu werden über die Festphasensynthese geeignete Reaktionspartner entweder am 5'-, am 3'-Ende oder innerhalb der Sequenz durch modifizierte Phosphoramidite eingebaut. Solche Modifikationen können beispielsweise Amine, Thiole, Alkine, Carbonsäuren und

Maleimide sein, die dann nach der Aufreinigung des fertigen Oligonukleotids mit den jeweils passenden Biokonjugations-Reagenzien (NHS-Estern, Thiolen, Aminen, Aziden, usw.) z.B. mit Fluoreszenzfarbstoffen und Affinitätsmarkern versehen werden.

## 1.4 Click-Chemie mit DNA und RNA

### 1.4.1 Click-Chemie

Wie der Name „Click“-Chemie bereits andeutet, steht bei Click-Reaktionen der modulare Charakter der Reaktion im Vordergrund. Das bedeutet, Click-Reaktionen werden in erster Linie dazu genutzt, eine kovalente Verknüpfung zwischen verschiedenen (funktionellen) Molekülstrukturen aufzubauen. Dabei unterscheiden sich Click-Reaktionen von herkömmlichen organischen Reaktionen gemäß Sharpless *et al.* durch folgende, strenge Kriterien:<sup>[91]</sup> Sie müssen modular und mit einer großen Anwendungsbreite eingesetzt werden können, dabei sehr hohe Reaktionsausbeuten und nur leicht zu entfernende Nebenprodukte ergeben. Die Reaktion sollte einfach durchführbar sein, d.h. auch tolerant gegenüber Sauerstoff und Wasser sein. Die Reaktion sollte (stereo-)spezifisch erfolgen. Die Ausgangsstoffe sollten leicht zugänglich und die Produkte einfach zu isolieren sein, d.h. ohne chromatographische Methoden. Außerdem sollten die Produkte eine hohe Stabilität aufweisen, auch unter physiologischen Bedingungen. Damit wird von Click-Reaktionen gefordert, dass sie gegenüber den von der Natur entwickelten Reaktionen zur Herstellung von Biomolekülen und anderen Wirkstoffen in nichts nachstehen.

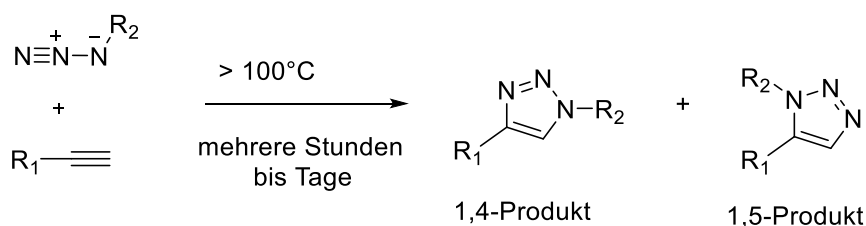


**Abb. 18** Überblick über die verschiedenen Reaktionsklassen der Click-Chemie mit nukleophilen Substitutionen an gespannten Ringsystemen, Additionen an ungesättigte Verbindungen, Carbonylreaktionen, die nicht auf Aldolreaktionen basieren und Cycloadditionsreaktionen.

Um die hohen Reaktionsausbeuten und die hohe Selektivität zu erreichen, müssen Click-Reaktionen eine hohe thermodynamische Triebkraft in der Größenordnung  $> 20 \text{ kcal mol}^{-1}$  besitzen.<sup>[91]</sup> Zu den Reaktionstypen, die diese Voraussetzung erfüllen (Abbildung 18), gehören zum Beispiel nukleophile Ringöffnungen an gespannten Ringsystemen wie Epoxiden, Aziridinen, sowie an Aziridinium- und Episulfonium-Systemen. Daneben zählen Additionsreaktionen an ungesättigte Verbindungen, z.B. Michael-Systeme, hinzu, sowie die Reaktion von Thiolen an Doppelbindungen. Während klassische Aldolreaktionen zum Aufbau von C-C-Bindungen üblicherweise Gleichgewichtsreaktionen sind, sind Reaktionen an Carbonylen zum Aufbau von Oximen, Hydrazonen, Harnstoff- und Thioharnstoff-Derivaten effiziente Click-Reaktionen. Die prominentesten Vertreter von Click Reaktionen sind Cycloadditionsreaktionen, bei denen energiereiche  $\pi$ -Bindungen in energieärmere  $\sigma$ -Bindungen umgewandelt werden. Hierzu zählen klassische Diels-Alder-Reaktionen ebenso wie 1,3-dipolare Cycloadditionen, von denen die Cu(I)-katalysierte Variante der Huisgen Alkin-Azid-Reaktion besonders hervorzuheben ist. Ein weiteres Beispiel ist die [4+1]-Cycloaddition von Tetrazin mit Isocyaniden.

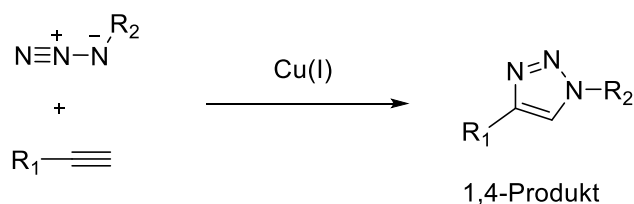
#### 1.4.2 Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC)

Bereits im Jahre 1893 von Arthur Michael (vgl. Michael Addition) erstmals berichtet<sup>[92]</sup> hat sich vor allem Rolf Huisgen intensiv mit dem Mechanismus der thermisch kontrollierten 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen Alkinen und Aziden und anderen Dipol-Dipolarophil-Paaren beschäftigt. Aus diesem Grund werden thermisch kontrollierte 1,3-dipolare Cycloadditionen heute auch nach Huisgen benannt. Bei der Alkin-Azid Cycloaddition reagiert ein 1,3-Dipol-Molekül mit einem Dipolarophil unter Ausbildung eines 1,2,3-Triazol-Fünfrings. 1,3-Dipole wie z.B. Azide, Diazoalkane, und Nitroxide, sind chemisch ambivalente Verbindungen, die an Position 1 und 3 des Dipols sowohl als Nukleophil, als auch als Elektrophil reagieren können. Es lassen sich entsprechend mesomere Oktett- und Sextett-Lewis-Strukturen formulieren, in denen die Ladung über jede Position des 1,3-Dipols verteilt wird, wobei jedoch nicht jede der Grenzstrukturen gleichermaßen zur Ladungsverteilung beiträgt. Ähnlich wie bei der klassischen Diels-Alder-Reaktion entscheidet die relative Lage zwischen HOMO und LUMO von Dipolar und Dipolarophil über den Verlauf der Reaktion. Im Falle vom Azid-Alkin-Reaktionspaaren liegen die Energieniveaus von HOMO und LUMO ähnlich hoch, sodass sowohl elektronenschiebende als auch -ziehende Substituenten die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen. Aus demselben Grund werden in der thermischen Azid-Alkin Cycloaddition in der Regel 1,4- und 1,5-Regioisomere erhalten.<sup>[93]</sup> Aufgrund der fehlenden Regioselektivität und der hohen Reaktionstemperaturen bzw. -dauern erfüllt die klassische Huisgen Alkin-Azid Cycloaddition nicht die Anforderungen einer Click-Reaktion.



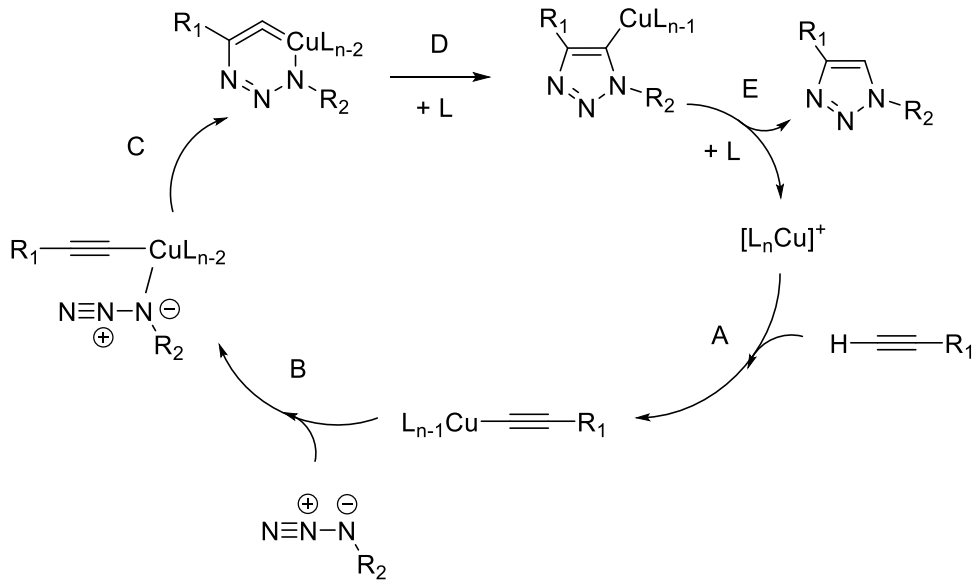
**Abb. 19** Reaktionsgleichung der thermischen Huisgen Alkin-Azid Cycloaddition

In zwei unabhängigen Arbeiten aus der Gruppe von Sharpless *et al.*<sup>[94]</sup> und Meldal *et al.*<sup>[95]</sup> wurden im Jahr 2002 schließlich Cu(I)-Salze als geeignete Katalysatoren für die Huisgen Alkin-Azid Cycloaddition identifiziert, wodurch die Rate gegenüber der unkatalysierten Reaktion um den Faktor  $10^7$  gesteigert werden konnte.<sup>[96]</sup> Die Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC) funktioniert bei Raumtemperatur in kurzen Reaktionszeiten und liefert ausschließlich das sterisch bevorzugte 1,4-substituierte Triazolprodukt und funktioniert dabei sowohl in organischem, als auch in wässrigem Milieu.



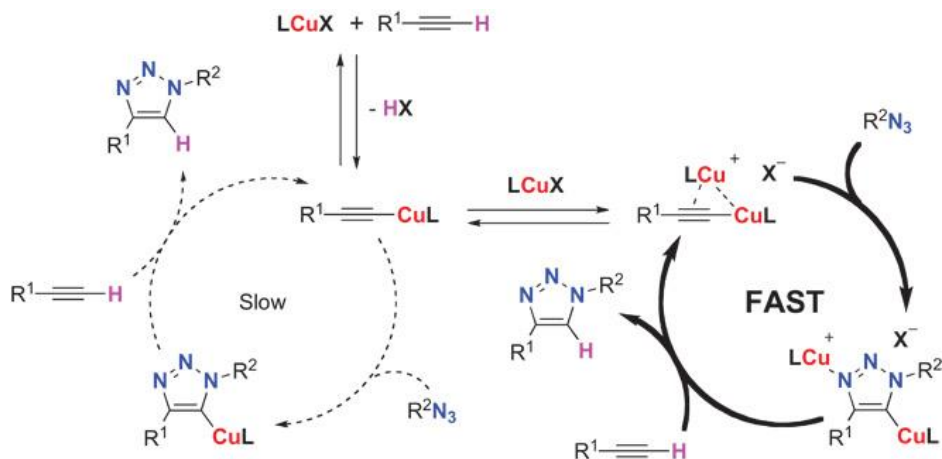
**Abb. 20** Reaktionsgleichung der Cu(I)-katalysierten Huisgen Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC Reaktion)

Während die thermische Huisgen Alkin-Azid Cycloaddition nach einem konzertierten Mechanismus verläuft, schlugen Sharpless *et al.* in ihrer ursprünglichen Arbeit – gestützt durch *ab initio* Dichtefunktionaltheorie-Rechnungen - einen stufenweise Mechanismus für die CuAAC Reaktion vor (Abbildung 21).<sup>[96]</sup> Demnach koordiniert im ersten Schritt das Cu(I)-Ion an das Alkin und bildet einen  $\pi$ -Komplex. In diesem  $\pi$ -Komplex erniedrigt sich der  $pK_a$  des terminalen Alkin-Protons um bis zu knapp 10 Einheiten, sodass das Kupfer unter Abgabe eines Liganden (Lösungsmittel) schließlich terminal bindet (Abbildung 21 A). Danach bindet das Azid über das innere Stickstoff-Atom an den Kupfer-Komplex unter Substitution eines weiteren Lösungsmittel-Moleküls (Abbildung 21 B). Daraufhin greift das äußere Azid-Stickstoff an C2 des Alkins an, wobei ein „ungewöhnlicher“ ungesättigter Sechsring-Metallazyklus des Cu(III)-Ions gebildet wird (Abbildung 21 C). Unter Verkleinerung des Rings zum Triazolyl-Kupfer-Derivat (Abbildung 21 D) wird schließlich der finale Triazolsubstituent abgespalten und der Cu(I)-Katalysator unter Resolvatation wiederhergestellt (Abbildung 21 E).



**Abb. 21** Ursprünglicher Mechanismus nach Sharpless *et al.* für die Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC)

Tatsächlich ist der Mechanismus der CuAAC Reaktion bis heute nicht endgültig aufgeklärt. Insbesondere wurde zuletzt in Frage gestellt, ob ein mononuklearer Cu(I)-Komplex der maßgebliche Katalyse-Faktor für den Reaktionsverlauf ist. Bertrand *et al.*<sup>[97]</sup>, Straub *et al.* und Tilley *et al.* konnten unterschiedliche dinukleare Cu(I)-Acetylen-Komplexe isolieren und u.a. durch Röntgenstrukturanalyse charakterisieren. Dabei stellten insbesondere Bertrand *et al.* fest, dass sowohl mono-, als auch binukleare Cu(I)-Komplexe die Cycloadditionsreaktion zwischen Azid und Alkin antreiben. Wird jedoch Benzylazid mit einem dinuklearen Cu(I)-Phenylacetylen-Komplex umgesetzt, so ist die Reaktionsrate über 94-mal schneller im Vergleich zur mononuklearen Cu(I)-Katalyse, wodurch eine kinetische Bevorzugung von dinuklearen Cu(I)-Intermediaten bei der CuAAC Reaktion nahegelegt wird. Ein entsprechender Mechanismus, wie von Bertrand *et al.* vorgeschlagen, ist in Abbildung 22 zusammengefasst. Aktuell werden weitere dinukleare Cu(I)-Intermediate hinsichtlich ihrer Relevanz für den CuAAC Mechanismus diskutiert.



**Abb. 22** Erweiterter Mechanismus der CuAAC Reaktion unter Berücksichtigung dinuklearer Cu(I)-Acetylen-Komplexe nach Bertrand *et al.*<sup>[97]</sup>

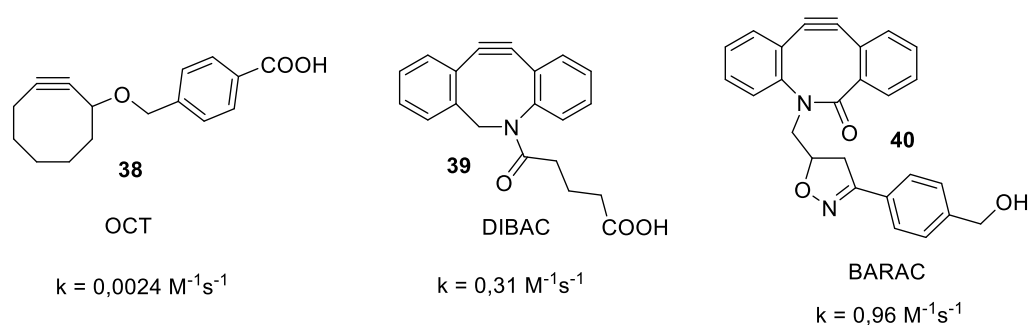


Gerade für Anwendungen im biologischen Kontext stellte die CuAAC Reaktion zunächst einige Herausforderungen bereit. So wird die reaktive Cu(I)-Spezies unter aeroben Bedingungen relativ schnell zu Cu(II) oxidiert oder disproportioniert und steht somit nicht mehr für die Cycloaddition zur Verfügung. Unglücklicherweise steigt mit zunehmender Cu(II)-Konzentration die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der Glaser-Kupplung als Konkurrenzreaktion, bei der zwei terminale Alkine kovalent miteinander verknüpft werden. Außerdem ist bekannt, dass Cu(I)-Acetylene polymere, unlösliche Strukturen bilden, die ebenfalls nicht der eigentlichen CuAAC-Reaktion zur Verfügung stehen. Eine erste universelle Lösung für diese Probleme wurde kurz nach der Entdeckung der CuAAC Reaktion durch die Entwicklung des (Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl(methyl)amin) TBTA-Liganden durch Fokin und Sharpless *et al.* bereitgestellt.<sup>[98]</sup> Während der (vierzählige) TBTA-Ligand das Kupfer-Ion in der Oxidationsstufe +I stabilisiert, bleibt offensichtlich genug sterischer Spielraum für den Katalysezyklus der CuAAC-Reaktion. Die Röntgenstrukturuntersuchung eines Cu(I)TBTA-Tetrafluorborat-Kristalls hat eine interessante dinukleare Struktur ergeben, bei der die Cu(I)-Zentren ausschließlich durch je vier Triazol-Liganden komplexiert und verbrückt werden, nicht aber durch das tertiäre Amin des TBTA-Liganden.<sup>[99]</sup>

Der Cu(I)TBTA-Komplex wird in der Praxis in der Regel aus einem Cu(II)-Salz und TBTA vorgebildet und, auch zur Vermeidung von polymeren Cu(I)-Strukturen, *in situ* durch ein mildes Reduktionsmittel wie Natriumascorbat oder TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin) in das reaktive Cu(I)TBTA überführt. Neben TBTA gibt es eine Vielzahl weiterer Liganden, die z.B. individuelle Anforderungen wie die Löslichkeit adressieren. So erhöht Tris(3-Hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA) die Löslichkeit des Cu(I)-Komplexes in wässrigem Milieu.

Die CuAAC Click-Reaktion ist insbesondere auch für biologische Anwendungen interessant, da sich mit ihr selbst bei niedrigen Konzentrationen in Zellen sehr einfach Reportermoleküle und Affinitätsmarker an Biomolekülen anbringen lassen. Dabei ist es von großem Vorteil, dass Alkine und Azide keine biologisch relevanten Funktionalitäten und somit bioorthogonale Kupplungspartner sind. Neben der Bioorthogonalität muss für biologische Anwendungen jedoch prinzipiell auch eine Biokompatibilität gewährleistet sein. Im Falle der CuAAC Click-Reaktion stellt das reaktive Cu(I)-Ion durch seine hohe Toxizität dabei zunächst ein Problem dar. Im Wesentlichen wurden zwei Strategien zur Lösung des Toxizitätsproblems entwickelt. Zum einen kann die Zelltoxizität vollständig aufgehoben werden durch Verwendung speziell entwickelter, wasserlöslicher Cu(I)-Liganden, bsp. 2-(4-((bis((1-tert-butyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethylhydrogensulfat (BTES). Bei Verwendung solcher Liganden wird außerdem eine ggü. TBTA schnellere CuAAC Reaktionsrate erzielt. Die zweite Strategie geht auf eine Arbeit von Wittig und Krebs zurück, die eine außerordentlich rasche thermische Reaktion zwischen Phenylazid und Cyclooctin, dem kleinstmöglichen

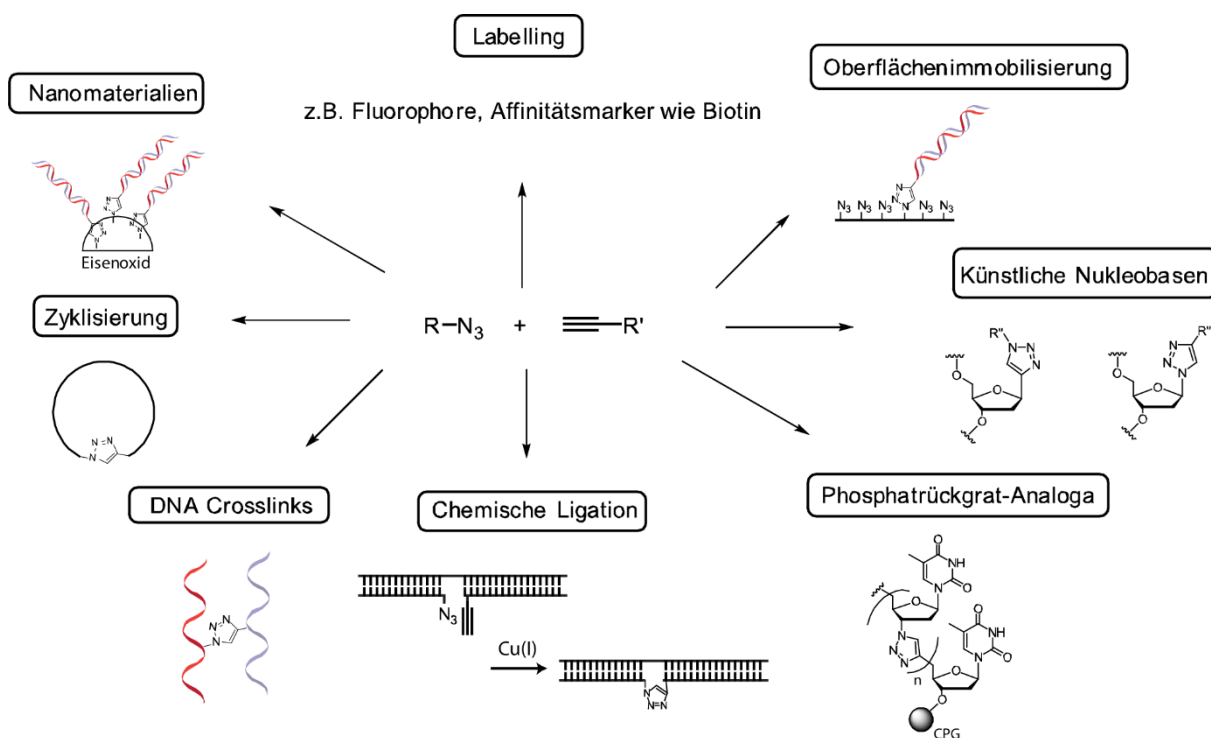
stabilen Kohlenstoffring mit Dreifachbindung, beobachteten.<sup>[100]</sup> Bertozzi *et al.* verknüpften solche gespannten Achtring-Alkine mit funktionellen Gruppen, die zur Konjugation an Biomoleküle verwendet werden können.<sup>[101]</sup> Mit dem Ziel die Ringspannung und damit die Reaktionsrate weiter zu erhöhen, wurden mit der Zeit verschiedene Substitutionsmuster am Achtring dargestellt und untersucht (Abbildung 23). So wird durch Anbringen zweier starrer Benzylreste und den Einbau von Heteroatomen bzw. einer Amidbindung im Cyclooctin die Reaktionsrate der kupferfreien SPAAC (strain promoted alkyne azide cycloaddition) um mehr als das Hundertfache gegenüber dem ursprünglichen OCT-Derivat **38** erhöht.<sup>[101]</sup>



**Abb. 23** Gespannte Cyclooctine für die kupferfreie Azid-Alkin Cycloaddition. Die Ringspannung kann durch Anbringen planarer Phenylgruppen und Einfügen von Heteroatomen weiter erhöht werden. Entsprechend steigen die Reaktionsraten der Cycloadditionsreaktion. <sup>[101]</sup>

### 1.4.3 CuAAC Reaktion mit DNA und RNA

Mit Hilfe der CuAAC-Reaktion wurden auf dem Gebiet der Nucleinsäuren vielfältige nicht-natürliche Oligonucleotid-Konstrukte hergestellt.<sup>[102,103]</sup>



**Abb. 24** Übersicht der Verwendung der CuAAC Reaktion zur Darstellung künstlicher Oligonucleotid-Konstrukte.<sup>[102,103]</sup>

Dabei dient die CuAAC häufig dem selektiven Markieren von Nucleinsäuren (DNA, RNA, PNA, usw.) mit Fluorophoren für Zell- bzw. Mikroskopiestudien, sowie mit Affinitätsmarkern wie Biotin. Darüber hinaus gibt es vor allem für DNA eine Vielzahl etablierter Anwendungsgebiete (Abbildung 24). Immobilisierungen von DNA auf Oberflächen oder Nanopartikeln wie Gold<sup>[104]</sup> und Eisenoxid<sup>[105]</sup> ergeben Hybrid-Materialien mit interessanten (magnetischen) Eigenschaften. Auch werden beispielsweise hexagonale DNA-Nanoarchitekturen über kovalente Triazolverknüpfungen stabilisiert und zu Dimeren und Trimeren verknüpft.<sup>[106]</sup> Über das Triazol-Gerüst lassen sich darüber hinaus neuartige Nucleobasen-Analoga herstellen, mit denen die kanonischen Nucleobasen um neue Wechselwirkungsmöglichkeiten erweitert werden.<sup>[107,108]</sup> Auch wird die CuAAC-Reaktion zur Festphasensynthese von Oligonucleotiden mit ungeladenem Triazolrückgrat statt des Phosphatrückgrats genutzt.<sup>[109]</sup> Entsprechende Duplexe weisen stärkere Bindungsaffinitäten als dsDNA auf. Die chemische Ligation über die CuAAC<sup>[110]</sup> ermöglicht es im Gegensatz zur biologischen Variante, auch 5'-5' und 3'-3'-Enden miteinander zu verknüpfen. CuAAC-ligierte DNA wird als Templat für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)<sup>[111]</sup>, sowie ligierte RNA als Templat für reverse Transkriptasen

erkannt<sup>[112]</sup>. Ebenfalls ist es gelungen funktionsfähige Ribozyme durch Ligation entsprechender Teilstränge zu generieren.<sup>[113]</sup> Schließlich wird die CuAAC-Reaktion zum Aufbau neuer DNA-Strukturen genutzt, bsp. durch kovalente Verknüpfung (crosslinks) zweier Stränge<sup>[114]</sup>, Konjugation an biologischen Wechselwirkungspartnern (Proteinen) oder durch intramolekulare Zyklisierung<sup>[115,116]</sup>.

Die Azid- und Alkinfunktionalitäten lassen sich in allen Anwendungen prinzipiell postsynthetisch über 5'- und 3'-Linker an das Oligonukleotid anbringen, das Alkin darüber hinaus als interne Modifikation über einen Linker oder durch direktes Anfügen an die Zuckereinheit (häufig in 2'-Position) oder an die Nukleobasen (wie z.B. das kommerziell erhältliche 5-Ethynyluridin) der verwendeten Phosphoramidite. Azid-modifizierte Phosphoramidite sind dagegen nicht kompatibel mit der Standardfestphasensynthese, da die reaktive P(III)-Spezies im Phosphoramidit bei hohen Konzentrationen (beim Isolieren) eine Staudinger Reaktion eingeht, bei der das Azid zum Amin reduziert wird. Wohl aber existieren Beispiele, in denen der spezifische Einbau von Aziden in Oligonukleotide über Festphasensynthese gelungen ist, bsp. über die Phosphodiester-Methode.<sup>[117]</sup> Ebenfalls eignen sich enzymatische Methoden zum Einbau von Azid-Modifikationen in Oligonukleotide.<sup>[118]</sup>

Sowohl DNA als auch RNA neigen unter CuAAC-Bedingungen zur Degradation, wenn keine Cu(I)-stabilisierenden Liganden wie TBTA oder THPTA verwendet werden. Ohne solche Liganden bildet Cu(I) reaktive Sauerstoffspezies, z.B. Hydroxyl-Radikale, die Strangbrüche induzieren können. Die labile Stelle ist hierbei die internukleosidische Phosphatdiester-Verknüpfung, die im Falle von RNA durch die benachbarte 2'-OH-Gruppe besonders anfällig ist. Es kann vermutet werden, dass nicht zuletzt aus diesem Grund von Anwendungen der CuAAC-Reaktion auf RNA erst in letzter Zeit vermehrt berichtet worden ist.

## 2. Motivation und Zielsetzung

Mit dem Ziel der temporären Inhibition funktioneller Nukleinsäuren haben sich, wie in Kapitel 1.2.3 erläutert, im Wesentlichen drei Methoden für den Einsatz photolabiler Schutzgruppen etabliert. So lässt sich beispielsweise die Watson-Crick-Basenpaarung zwischen zwei Oligonukleotiden unterbinden, wenn die Nukleobasen mit einer photolabilen Schutzgruppe modifiziert und gezielt in die Oligonukleotid-Sequenz eingebaut werden. Im Allgemeinen wird beobachtet, dass für eine vollständige Deaktivierung des Oligonukleotids ein multipler Einbau der photolabilen Schutzgruppen erforderlich ist. Für ein vollständiges Aus/An-Schalten müssen daher häufig hohe Bestrahlungsdauern und -intensitäten in Kauf genommen werden, die die Anwendungsmöglichkeiten *in vivo* durch lichtinduzierte Schäden am biologischen System einschränken. Neben Oligonukleotiden mit teilkomplementärem Inhibitorstrang sind End-zu-End-verknüpfte zyklische Oligonukleotide zur Regulation der Genexpression Gegenstand aktuellster Forschung. Liegt das funktionelle Oligonukleotid über einen photolabilen Linker zyklisiert vor, so kann bei geeigneten Ringgrößen eine Hybridisierung mit dem linearen Ziel-Oligonukleotid erst nach Belichtung erfolgen. Dabei wird nicht nur die Anzahl der benötigten photolabilen Schutzgruppen auf eine reduziert, sondern es erhöht sich gleichfalls auch die Stabilität solcher Oligonukleotide gegenüber Exonukleasen.

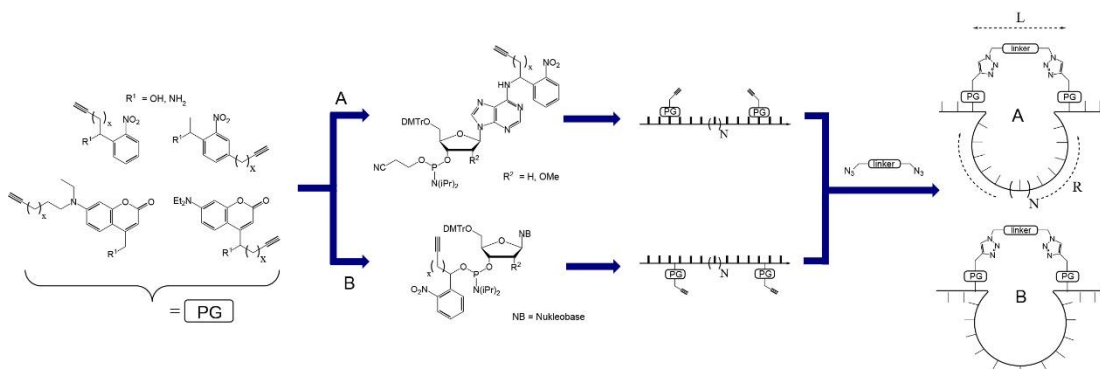
Während sich die bisherigen in der Literatur bekannten Ansätze (z.B. enzymatische Ligation, Succinimid-Kupplung, Amid-Verknüpfung) lediglich auf eine End-zu-End-Verknüpfung der Oligonukleotid-Stränge beschränken, wären durch gezielte Modifikation von Nukleosiden mit verknüpfbaren funktionellen Gruppen nicht nur zyklische Oligonukleotide, sondern auch verzweigte Strukturen (branched DNA) mit abstehenden Sequenzen (dangling sequences) zugänglich. Die Inhibition des funktionellen Oligonukleotids basierte hierbei auf einer kovalenten, intramolekularen Strukturänderung an Stelle einer einfachen sterischen Abschirmung. Über den Einsatz als antisense-Oligonukleotid hinaus eröffneten sich durch diesen Ansatz völlig neue, strukturbasierte Anwendungsmöglichkeiten. Katalytisch wirkende Sekundärstrukturen wie die Haarnadelstrukturen von DNAzymen und Ribozymen könnten durch alternative, kovalent erzwungene Sekundärstrukturen temporär deaktiviert werden. (Anti-)Terminator-Schleifen, wie sie als regulierendes Element der Transkription in Riboswitches bekannt sind, könnten durch Einsatz eines solchen, photolabilen, intramolekularen Linkers in einem der möglichen Faltungszustände festgehalten und in Faltungskinetikstudien zeitlich wie räumlich exakt in den jeweils anderen überführt werden.

Für den Aufbau zyklischer Strukturen stehen prinzipiell verschiedene Reaktionstypen zur Verfügung. Die Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC-Reaktion) nach Meldal und Sharpless erfährt auf vielen Gebieten der Chemie große Beliebtheit. Zu den Vorzügen dieser Reaktionsklasse zählt die einfache Zugänglichkeit von Azid- und Alkin-Derivaten der zu kuppelnden Komponenten, deren Inertheit gegenüber einer Vielzahl biologisch relevanter

funktioneller Gruppen, sowie die Bildung eines nicht-toxischen und stabilen Triazol-Produkts. In Hinblick auf DNA wurde die CuAAC-Reaktion bisher unter anderem dafür verwendet, DNA mit Reportergruppen wie Fluoreszenzmarkern auszustatten, DNA-Analoga mit alternativen Nucleobasen oder einem alternativen Rückgrat herzustellen, sowie für die Immobilisierung von DNA auf Oberflächen und Nanopartikeln (siehe auch Kapitel 1.4.3). Sowohl das intermolekulare Crosslinking von DNA, als auch der Aufbau zyklischer und verzweigter DNA-Strukturen, wie sie in der vorliegenden Arbeit unter anderem angestrebt werden, wurden bereits mit Hilfe der CuAAC realisiert.

Auf diesen Arbeiten aufbauend sollen im Rahmen der vorliegenden Dissertation neue „Architekturen“ für die Herstellung photoaktivierbarer Oligonucleotide mit gutem An-/Aus-Schaltverhalten entwickelt werden. Hierzu werden im ersten großen Projektteil DNA- und RNA-Oligonucleotide mit zyklischen Strukturelementen erzeugt. In Hinblick auf den Einsatz als Antisense-Oligonucleotide liegt der Fokus der Arbeit darauf, sowohl durch eine ungünstige Konformation des zyklisierten Oligonucleotids, als auch durch sterische Blockade der Watson-Crick-Basenpaare mittels eines Linkers eine möglichst hohe Duplexdestabilisierung des Doppelstrangs zu erzielen. Für die Zyklisierung werden zwei verschiedene Anknüpfungspunkte am Nucleosid untersucht, wobei auf die individuellen Vor- und Nachteile in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen werden wird. Die erste Verknüpfungsstrategie erfolgt über die Watson-Crick-Basenseite (Abbildung 25a), wofür zunächst geeignete Alkin-modifizierte und photolabil geschützte Nucleosid-Phosphoramidite entwickelt werden müssen. Unter Variation verschiedener Zyklisierungsparameter (Ringgröße, Linkerlänge, photolabile Schutzgruppe, usw.) soll daraufhin eine optimale Zyklisierungsstrategie am Oligonucleotid erarbeitet werden. Da die Zyklisierung hierbei intrasequentiell erfolgt, können insbesondere auch lange funktionelle Oligonucleotide durch Aufbau temporärer, zyklischer Strukturelemente photoregulierbar gemacht werden. Als solch ein funktionelles Oligonucleotid wird in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Günter Mayer (Universität Bonn) das 90-mer C10-DNA-Aptamer untersucht, welches selektiv gegen humane Burkitt-Lymphom-Zellen (Ramos-Zellen) bindet und von diesen aufgenommen wird. Durch Einbau einer minimalen Anzahl photolabiler Modifikationen und durch geeignete Zyklisierung mittels CuAAC-Reaktion soll die native Struktur des Vollängen-Aptamers und damit dessen Affinität gegenüber Burkitt-Lymphom-Zellen temporär inhibiert und nach Belichten wieder vollständig hergestellt werden. Während die Zyklisierungsstrategie A über die Watson-Crick-Basenseite synthetisch sehr aufwändig ist (für jede der kanonischen Nucleobasen muss über mehrstufige Synthese ein eigenes Phosphoramidit-Derivat hergestellt werden), würde ein später Einbau der photolabilen und alkylierten Schutzgruppen in Form eines modifizierten Phosphitylierungs-Reagenzes einen viel einfacheren und ökonomischeren Zugang zu zyklisierten Oligonucleotiden ermöglichen. Gerade letzteres ist von großer Wichtigkeit für Anwendungen, bei denen größere

Materialmengen an photolabil geschütztem Oligonukleotid benötigt werden. Im zweiten Projektteil dieser Arbeit soll daher eine solche Synthese nach Strategie B entwickelt und dazu genutzt werden, eine Zyklisierung von DNA- und RNA-Oligonukleotiden über das Phosphatrückgrat zu ermöglichen. Ein Ziel hierbei ist die exemplarische Herstellung einer photoaktivierbaren, zyklisierten AntimiR-34a, welche für folgende *in vivo* Studien zur Regulation der Apoptose in Herzgewebe dienen soll.



**Abb. 25** Arbeitsplan für die unterschiedlichen Strategien zur Zyklisierung von photoaktivierbaren Oligonukleotiden (A) über die Watson-Crick-Basenseite und (B) über das Phosphat-Rückgrat

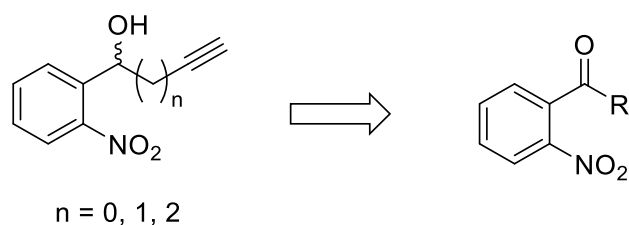
Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwiefern der Duplexdestabilisierende Effekt einer einzigen photolabilen Schutzgruppe gesteigert werden kann. In vorausgegangenen Studien im Arbeitskreis Heckel wurde festgestellt, dass der Effekt einer einzelnen photolabilen Schutzgruppe, die an der Watson-Crick-Basenseite der Nucleobasen angebracht wird, einen limitierten Effekt auf die Duplexstabilität hat. Wird die photolabile Schutzgruppe bei gleich bleibender Sequenz variiert, so tritt eine Sättigung gemessener Schmelzpunktniedrigungen auf. Eine Möglichkeit, den destabilisierenden Einfluss einer einzelnen photolabilen Schutzgruppe zu erhöhen, ist es, den sterischen Anspruch der photolabilen Schutzgruppe zu vergrößern. Durch den modularen Charakter der Alkin-modifizierten Schutzgruppenderivate, die in dieser Arbeit entwickelt werden, bietet sich eine optimale Möglichkeit, verschiedene sperrige Substituenten postsynthetisch mittels CuAAC-Reaktion an modifizierte Oligonukleotide anzufügen. Auf diese Weise kann in kurzer Zeit der Einfluss verschiedener Reste auf die Duplexstabilität mittels Schmelzpunktmessungen untersucht und ein optimiertes Schutzgruppendedesign identifiziert werden. Um darüber hinaus die strukturellen Grundlagen der Duplexdestabilisierung genauer zu verstehen, wird das sogenannte „Click-Screen“-Projekt in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerhard Hummer (MPI Biophysik, Frankfurt) um Strukturmodelle aus MD-Simulationen ergänzt und ein Modell für die Wirkung sperriger photolabiler Schutzgruppen in DNA-Duplexen entwickelt.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Synthese Alkin-modifizierter photolabiler Schutzgruppen

##### 3.1.1 Alkin-modifizierte *ortho*-Nitrobenzyl-Schutzgruppen

Als Grundlage für die angestrebten Zyklisierungsreaktionen mit Oligonukleotiden und für die Synthese sperrig geschützter Oligonukleotide dienen photolabile Schutzgruppen, die an geeigneten Stellen mit einer Alkin-Funktionalität verknüpft sind. Die alternative Möglichkeit, photolabile Schutzgruppen für die CuAAC Click-Reaktion mit Aziden zu derivatisieren, ist synthetisch zwar sehr einfach zu realisieren (nukleophile Substitution halogener Vorläufer), aber nicht kompatibel mit der Phosphoramidit-Chemie. Letzterer Ansatz wird daher in dieser Arbeit nicht verfolgt. Eine geeignete Schutzgruppe muss neben der Alkin-Funktionalität im Allgemeinen eine weitere funktionelle Gruppe zur Verknüpfung mit Nucleobasen besitzen. Für Thymidin, Uridin und Guanodin ist dies eine Alkohol-, für Cytidin und Adenosin eine Amino-Funktion. Diese Funktionalitäten werden üblicherweise über Carbonylchemie eingeführt, beispielsweise die gängige NPE-Schutzgruppe durch Reduktion mit Natriumborhydrid aus 2-Nitroacetophenon. Aufgrund der einfachen (kommerziellen) Zugänglichkeit geeigneter Vorläufer wurde der Fokus der Arbeit zu Beginn auf die Nitrobenzyl-Schutzgruppen gelegt. Dabei stellte sich zunächst die Frage, ob das Alkin am Benzylring oder außerhalb des Aromaten angebracht werden soll. Gerade in Kombination mit der aromatischen Nitrogruppe stellt sich eine direkte Alkinylierung am Aromaten als umständlich heraus, während über nukleophile Addition an eine benzyliche Carbonylgruppe zum einen der Alkinrest vergleichsweise einfach, zum anderen gleichzeitig der benötigte Alkohol unter Ausbildung eines chiralen Zentrums an die Seitenkette angebracht werden kann. Im Vorfeld wurde zudem berücksichtigt, dass bei einer späteren CuAAC am Oligonukleotid der Abstand der Alkin-Funktionalität zur Schutzgruppe durch sterische Konflikte einen Einfluss auf die Reaktionsausbeute haben kann.

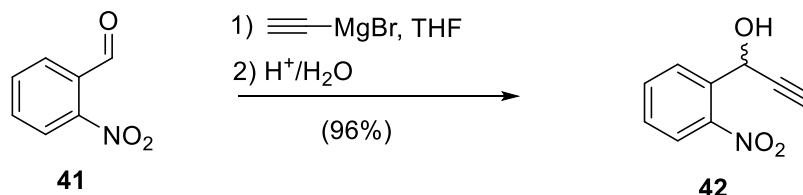


**Abb. 26** Zielstruktur Alkin-modifizierter *ortho*-Nitrobenzyl-Derivate mit unterschiedlicher Länge  $n$  des  $\text{CH}_2$ -Abstandhalters. Die Alkin-Funktionalität wird jeweils über Carbonyl-Vorläufer ( $\text{R} = \text{H}, \text{CH}_3$ ) eingeführt.

Aus diesem Grund sollte die Alkinfunktionalität mit variablen  $\text{CH}_2$ -Einheiten ( $n = 0, 1$  und  $2$ ) als Platzhalter zur photolabilen Schutzgruppe dargestellt werden (Abbildung 26).

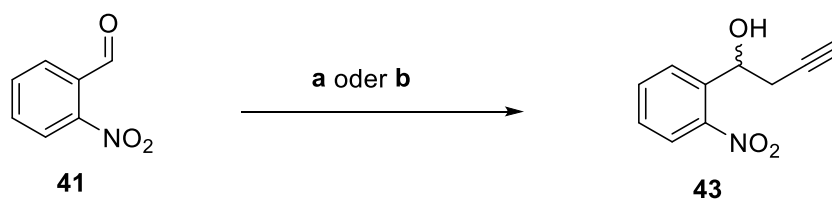


Das Derivat 1-(2-Nitrophenyl)prop-2-in-1-ol (NPPY-OH, **42**) mit direkt verknüpfter Dreifachbindung ( $n = 0$ ) wurde ausgehend von 2-Nitrobenzaldehyd (**41**) über eine GRIGNARDREAKTION mit Ethynylmagnesiumbromid in THF mit nahezu quantitativen Ausbeuten erhalten.



**Abb. 27** Synthese von 1-(2-Nitrophenyl)prop-2-in-1-ol (NPPY-OH) (**42**)

Die Synthese von 1-(2-Nitrophenyl)but-3-in-1-ol (NPBY-OH) mit einer Methylengruppe als Abstandhalter ( $n = 1$ ) wurde zunächst gemäß einer Literaturvorschrift von Chowdhury *et al.* durchgeführt.<sup>[119]</sup> Hierbei wird 2-Nitrobenzaldehyd (**41**) mit Propargylbromid und Zink in einer BARBIER-REAKTION mit Ausbeuten von im bestenfalls 55% umgesetzt.

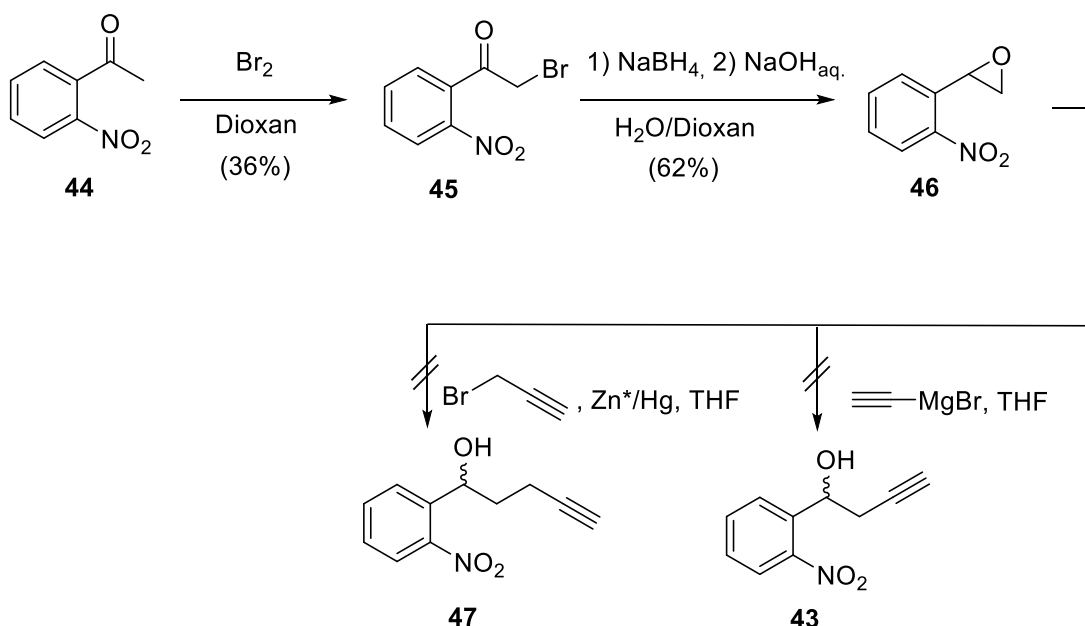


**Abb. 28** Synthese von 1-(2-Nitrophenyl)but-3-in-1-ol (NPBY-OH) (**43**) nach Literaturvorschrift<sup>[119]</sup> a) Propargylbromid,  $\text{Zn}^*/\text{Hg}^{\text{II}}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$  in THF (55%) und optimiert b) Propargylbromid,  $\text{Zn}^*/\text{HCl}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$  in DMF (76%)

Für den Erfolg der oben beschriebenen Reaktion ist die Aktivierung des Zinks ein entscheidender Schritt. Erste Versuche der Aktivierung durch Salzsäure blieben jedoch zunächst ohne Erfolg, weswegen im weiteren Verlauf verschiedene Aktivierungsmethoden getestet wurden. Für die Propargylierung von Aldehyden wurde beispielsweise von Chattopadhyay *et al.* die Verwendung von  $\text{Zn}/\text{FeCl}_3$  und  $\text{Zn}/\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  vorgeschlagen<sup>[120]</sup>, welche jedoch keine positiven Resultate ergab. Auch wurde ein reaktives Zink-Kupfer-Paar dargestellt oder kommerziell erworben und in beiden Fällen ohne Produktbildung verwendet. Erstmals gelang die Reaktion durch Amalgambildung von Zink mit  $\text{HgCl}_2$ , wobei die Reproduzierbarkeit der Reaktion große Probleme bereitete. Aus diesem Grund und weil Quecksilbersalze durch die hohe Toxizität möglichst substituiert werden sollten, wurden weitere Optimierungsversuche der obigen Reaktion durchgeführt. In einer Arbeit von Kumar und Rai wurde eine Methode zur Reduktion von aromatischen Nitro-Gruppen mittels Zink diskutiert.<sup>[121]</sup> Hierbei wurde THF als ein geeignetes Lösungsmittel für die Reduktionsreaktion identifiziert, während andere Lösungsmittel wie DMF und Acetonitril keinerlei Reduktion

ergaben. Da die Reduktion der Nitrogruppe zum Amin bei der Darstellung von Verbindung **43** eine potentielle Nebenreaktion darstellt, ist die Wahl des Lösungsmittels THF im Protokoll von Chowdhury *et al.* ungünstig. Aus diesem Grund wurde die obige BARBIER-Reaktion mit verschiedenen Lösungsmitteln getestet. Tatsächlich erfolgte eine quantitative Umsetzung in DMF innerhalb kurzer Reaktionszeiten sowohl mit dem kommerziellen Zink-Kupfer-Paar, als auch mit einfachem säureaktiviertem Zink. Keine Reaktion trat unter diesen Bedingungen dagegen in Acetonitril oder THF ein, lediglich die Quecksilberaktivierung in Kombination mit THF führte zu geringfügiger Produktbildung. Für den weiteren Verlauf der Arbeit wurde schlussfolgernd die optimierte Reaktionsdurchführung gemäß Abbildung 28b verwendet.

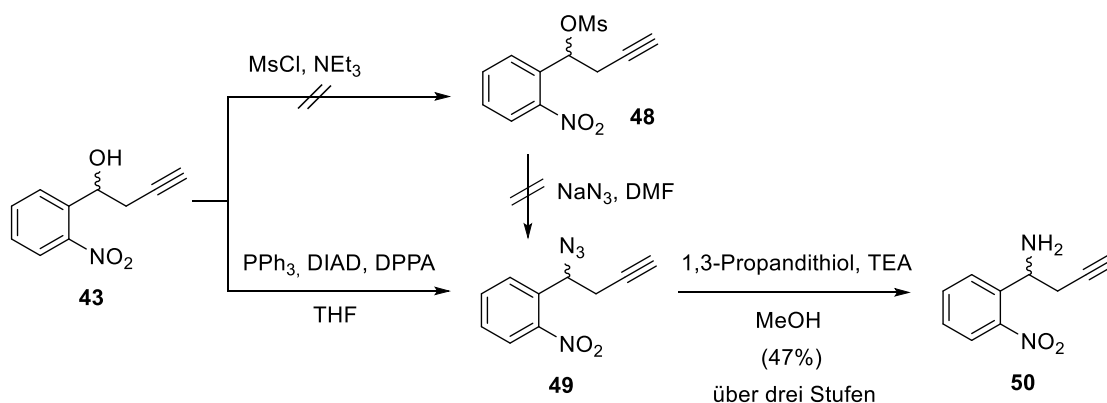
Wie in Kapitel 3.3 gezeigt werden wird, erweist sich NPBY bereits als geeigneter Vorläufer für die spätere CuAAC an Oligonukleotiden. Im Rahmen der Bachelorarbeit von Dominik Scheliu, B. Sc. wurde ein Versuch der Synthese des 1-(2-Nitrophenyl)pent-4-in-1-ol Homologen ( $n = 2$ ) unternommen.



**Abb. 29** Geplante Syntheseroute zur Darstellung von 1-(2-Nitrophenyl)pent-4-in-1-ol (**47**) und alternative Synthese von NPBY (**43**) über eine selektive Epoxid-Öffnung

Die Idee hinter dem in Abbildung 29 zusammengefassten Synthesepfad ist eine selektive Öffnung des Epoxids mit alkylierten Organometallverbindungen. Hierzu wurde 2-Nitroacetophenon zunächst mit mäßigen Ausbeuten bromiert. In der darauffolgenden Reduktion des Ketons mit Natriumborhydrid wird im Basischen das Epoxid durch intramolekulare nukleophile Substitution gebildet. Dieses Epoxid sollte nun zu den Verbindungen **47** und **43** nukleophil geöffnet werden. Während ein Nucleophil normalerweise an der sterisch weniger anspruchsvollen Seite des Epoxids nach einem  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus angreift (wie hier erwünscht), kann unter Säurekatalyse der Angriff über das stabilisierte, höher substituierte Kohlenstoff-Atom gemäß  $\text{S}_{\text{N}}1$  erfolgen. Eine niedrige Reaktionstemperatur von 0

°C sollte die Bildung des erwünschten sekundären Alkohols zudem kinetisch begünstigen. Die Ringöffnung zum NPBY-Derivat **43** führte zu keiner Produktbildung, sondern – in Abhängigkeit der zusätzlich zugeführten Menge an Ethynylmagnesiumbromid – mit einer langsamen Kinetik zu einer Ringöffnung durch Bromid, wodurch der bromierte Vorläufer des Epoxids **46** zurückgebildet wurde. Im Gegensatz dazu führte die BARBIER-REAKTION mit Propargylbromid zu gar keinem Umsatz. Die Reaktion hätte im Nachhinein mit dem verbesserten Protokoll (Abbildung 28b) wiederholt werden können, allerdings wurden die alkylierten Nitrobenzyl-Derivate mit Methylene-Abstandhaltern  $n = 0$  und  $2$  (Verbindungen **42** und **47**) im weiteren Verlauf der Arbeiten nicht mehr benötigt.



**Abb. 30** Syntheseroute zur Darstellung von NPBY-Amin **50**

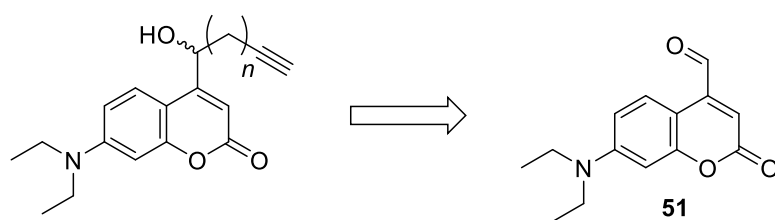
Wie zuvor erwähnt, wird für die Kupplung an die Nucleobasen von Cytidin und Adenosin ein Amino-Derivat der photolabilen Schutzgruppe benötigt. Zu diesem Zwecke wurde NPBY-OH (**47**) zunächst ins Azid überführt. Dies erfolgt normalerweise sehr zuverlässig, indem die Hydroxyl-Gruppe z.B. mit Mesylchlorid in eine gute Abgangsgruppe überführt und anschließend durch Natriumazid in einem polaren Lösungsmittel wie DMF substituiert wird. Die entsprechende Syntheseroute schlug im Falle von Verbindung **47** jedoch fehl. Eine Analytik mittels Dünnschichtchromatographie ergab einen quantitativen Umsatz nach Zugabe des Mesylchlorids in eine neue Verbindung, die einen positiven qualitativen Nachweis der OH-Gruppe (Anisaldehyd-Färbereagenz) ergab und zugleich keine Reaktion mit Natriumazid einging. Da ein solches Reaktionsverhalten für analoge Nitrobenzyl-Derivate ohne Dreifachbindung wie z.B. NPE nicht beobachtet wird, liegt die Vermutung nahe, dass eine Additionsreaktion des Mesylchlorids an die Dreifachbindung erfolgt ist. Die Überführung der Hydroxylgruppe zum Azid wurde daraufhin über eine MITSUNOBU-REAKTION mit Diphenylphosphorylazid (DPPA) als Azid-Quelle durchgeführt. Dabei konnte auf eine Literaturvorschrift von Sandgren *et al.* zur Synthese eines Amino-Analogon von NPBY ohne die Nitrogruppe aufgebaut werden.<sup>[122]</sup> Im darauffolgenden Schritt wurde das Azid mit 1,3-

Propandithiol und TEA in Methanol zum NPBY-Amin **50** reduziert. Die Reaktionsausbeute lag hier beginnend beim Aldehyden **41** über drei Stufen bei guten 47%. Das einzig nennenswerte Nebenprodukt der MITSUNOBU-REAKTION wird durch Reduktion des Azids zum Amin über eine STAUDINGER-REAKTION mit Triphenylphosphin erhalten. Da die Folgereaktion exakt dieses Produkt ergeben soll, ist für die hier etablierte Syntheseroute keine chromatographische Aufreinigung der Zwischenstufen erforderlich.

### 3.1.2 Alkin-modifizierte Cumarin-Schutzgruppen

#### 3.1.2.1 7-Diethylamino-4-methylcumarin-Derivate

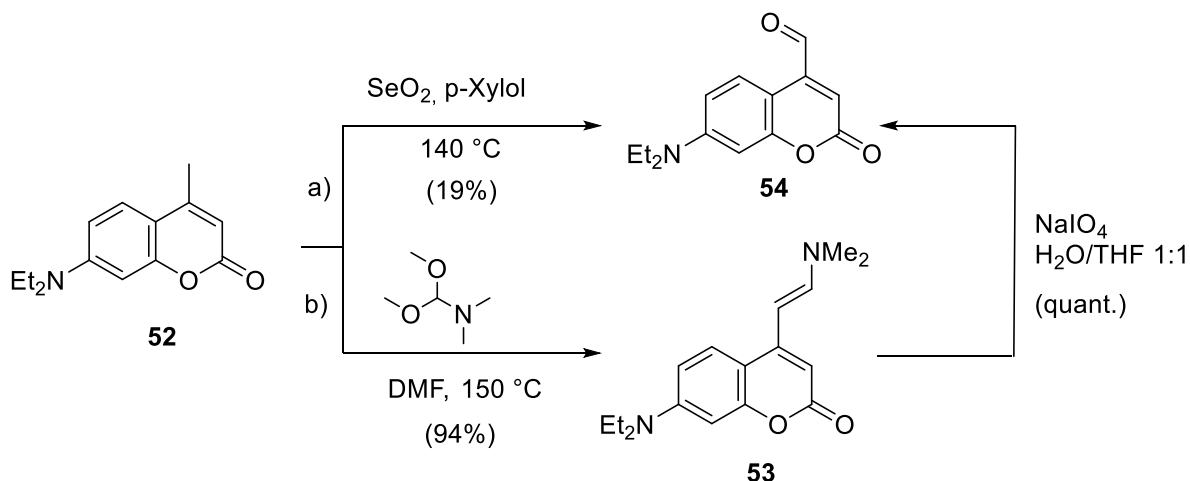
Im Vergleich zur *ortho*-Nitrobenzylschutzgruppe bietet die Struktur der 7-Diethylamino-4-methylcumarin-Schutzgruppe mehrere potentielle Verknüpfungsstellen für eine Alkinmodifikation. Ein in Frage kommender Ansatz ist die Verknüpfung über die 7-Amino-Gruppe, da ein Austausch von Ethyl- zu Propargylrest keinen signifikant negativen Einfluss auf die photochemischen Eigenschaften der Cumarinschutzgruppe erwarten lässt. Hierfür würde das Cumarin-Gerüst über eine PECHMANN-KONDENSATION aus einem entsprechend substituierten 3-Aminophenol-Derivat und Acetessigester aufgebaut und zum Alkohol-Derivat konvertiert werden. Daneben kann auch die 3-Position des Cumarin-Gerüsts über eine Halogenierung und anschließende Kreuzkupplung mit einem Propargylrest funktionalisiert werden. Der Vorteil dieser Ansätze ist es, dass in beiden Fällen kein Chiralitätszentrum entsteht. Der Nachteil liegt dagegen in der Anzahl notwendiger Syntheseschritte bis zum Erreichen des Schutzgruppen-Alkohols. Da möglichst frühzeitig überprüft werden sollte, ob sich Oligonukleotide über eine CuAAC Reaktion zyklisieren lassen, wurde auch im Falle der Cumarin-Schutzgruppen die einfachere Alkinylierung über eine Carbonylfunktionalität gewählt (Abbildung 31).



**Abb. 31** Zielstruktur Alkin-modifizierter 7-Diethylamino-4-methylcumarin-Derivate mit unterschiedlicher Länge  $n$  des  $\text{CH}_2$ -Abstandhalters. Die Alkin-Funktionalität wird analog zu den Nitrobenzylderivaten jeweils über einen Carbonyl-Vorläufer eingeführt.

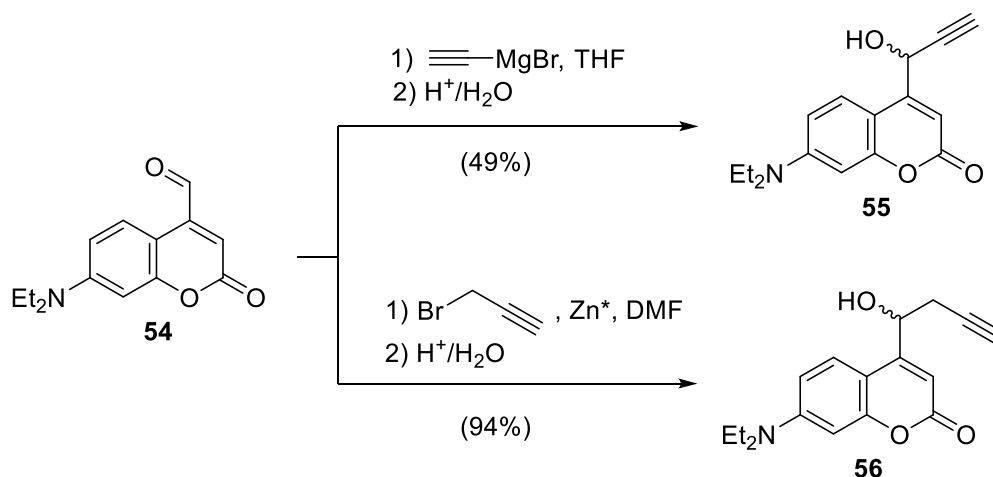
Die Synthese des DEACM-Aldehyden **51** ist in der Literatur bereits von Schönleber *et al.* berichtet worden (Abbildung 32a).<sup>[123]</sup> Das Ausgangsmaterial der Synthese ist 7-Diethylamino-4-methylcumarin (**52**), welches mit Hilfe von Selendioxid direkt zum Aldehyd oxidiert wird. Die Ausbeuten liegen hier jedoch sehr niedrig, da unter anderem auch der DEACM-Alkohol als

Nebenprodukt gebildet wird. Darüber hinaus lässt sich die Reaktion nicht in beliebig großem Maßstab durchführen. In entsprechenden eigenen Experimenten konnte beobachtet werden, dass mit zunehmender Materialmenge die Reaktionsausbeute drastisch zurückgeht.



**Abb. 32** Synthese des DEACM-Aldehyden **54** nach (a) Schönleber *et al.*<sup>[123]</sup> und nach (b) Weinrich *et al.*<sup>[124]</sup>

Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Arbeit ein alternativer Syntheseweg adaptiert, welcher kurz nach Beginn dieser Dissertation von Weinrich *et al.* entwickelt wurde.<sup>[124]</sup> Hierbei wird Verbindung **52** zunächst mit Dimethylformamid-Dimethylacetal (DMFDMA) in das Enamin **53** überführt, welches im Anschluss mit Natriumperiodat oxidativ zum Aldehyden **54** gespalten wird. Die Ausbeuten der einzelnen Reaktionen liegen jeweils über 90%.



**Abb. 33** Synthese der Alkin-modifizierten DEACPY-Schutzgruppe **55** und der DEACBY-Schutzgruppe **56**

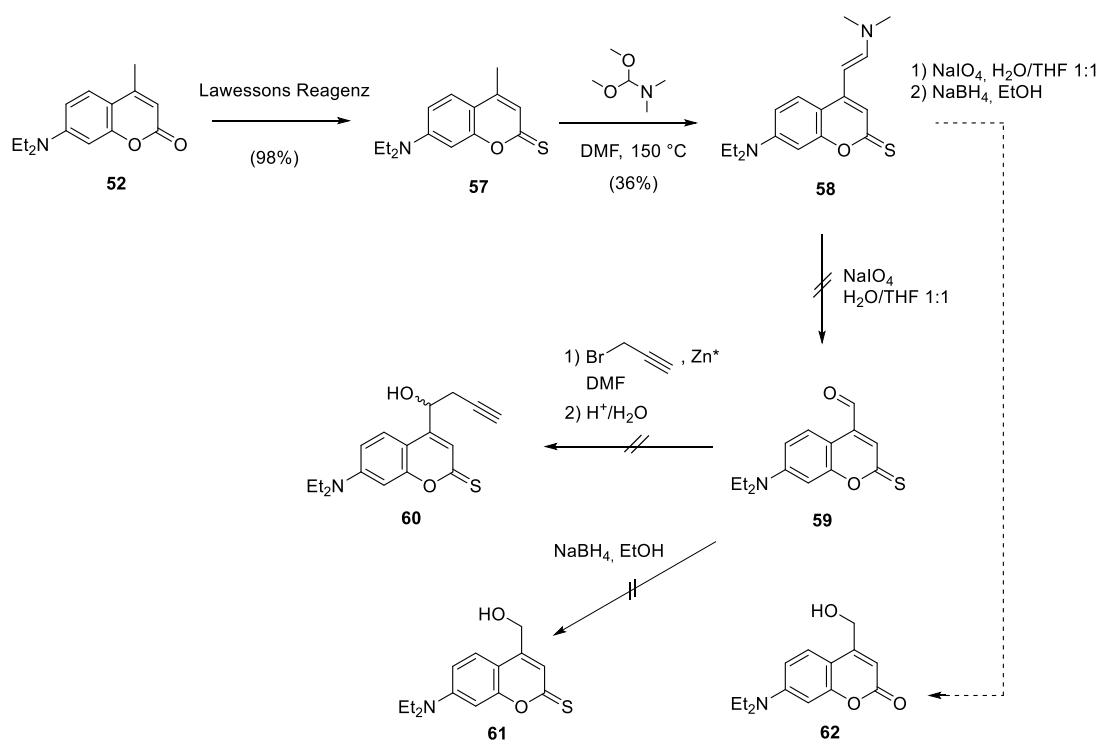
DEACM-Aldehyd **54** wurde daraufhin mit Ethynylmagnesiumbromid in einer GRIGNARD-REAKTION zum Diethylaminocumarinprop-2-in-1-ol (DEACPY-OH, **55**) mit einer Ausbeute von

49% umgesetzt, wobei die Reduktion von **54** zum DEACM-Alkohol als Konkurrenzreaktion auftrat. Das homologe Diethylaminocumarinbut-3-in-1-ol (DEACBY-OH, **56**) mit einer Methylene-Gruppe als Abstandhalter ( $n = 1$ ) wurde analog zu NPB-Y-OH **43** mittels BARBIER-REAKTION in einer maximalen Ausbeute von 94% erhalten. Die Synthese von Verbindung **56**, die ausschließlich für die späteren Zyklisierungsreaktionen verwendet werden wird, ist über drei Stufen außerordentlich effizient. Das Reaktionsprodukt der Enaminbildung im ersten Schritt, Verbindung **53**, fällt beim Abkühlen der Reaktionslösung in so hoher Reinheit aus, dass – wird nur mit diesem Kristallisationsprodukt weitergearbeitet – die Folgereaktionen ohne Notwendigkeit präparativer Säulenchromatographie in nahezu quantitativer Ausbeute vollzogen werden können.

### 3.1.2.2 7-Diethylamino-4-methylthiocumarin-Derivate

Zu Beginn der vorliegenden Dissertation wurde gerade die neue 7-Diethylamino-4-methylthiocumarin-Schutzgruppe ("Thiocumarin") aus der Gruppe von Jullien *et al.* publiziert. Diese weist hohe molare Extinktionskoeffizienten bei Wellenlängen bis über 500 nm auf und ist daher eine interessante photolabile Schutzgruppe für biologische Anwendungen. Aus diesem Grund wurde sich in dieser Dissertation ebenfalls damit beschäftigt, das Thiocumarin für Anwendungen mit photoaktivierbaren Oligonukleotiden zugänglich zu machen. Für die Synthese des Thiocumarin-Alkohols **61** nach Jullien *et al.* wird der DEACM-Alkohol **61** zunächst an der Hydroxyl-Gruppe acetyliert, daraufhin findet mit Lawessons Reagenz ein Sauerstoff-Schwefel-Austausch an der Carbonylgruppe statt und schließlich folgt die Entschützung des Alkohols.<sup>[24]</sup> Beginnend bei 7-Diethylamino-4-methylcumarin (**52**) ergibt dies insgesamt sechs notwendige Syntheseschritte. In Abbildung **34** ist eine modifizierte Syntheseroute zusammengefasst, die ausgehend von Verbindung **52** zuerst den Schwefelaustausch und im folgenden Verlauf analog zur Synthese von DEACBY-OH **56** durch Enaminbildung, Periodatspaltung und BARBIER-REAKTION das Thio-DEACBY-OH **60** ergeben sollte. Dabei würde gleichzeitig die Synthese des literaturbekannten Thiocumarin-Alkohols **61** durch Reduktion des Thio-DEACM Aldehyden **59** um zwei Schritte verkürzt. Im ersten Schritt der Syntheseroute konnte Ausgangsverbindung **52** in nahezu quantitativer Ausbeute mit Hilfe von Lawessons Reagenz zum Thio-Analogen **57** umgesetzt werden. Die darauffolgende Enaminbildung zum Cummarinderivat **58** gelang mit nur mäßigen Ausbeuten von 36%. Verbindung **58** wurde daraufhin mit Natriumperiodat versetzt. Qualitative Dünnschichtchromatographie zeigte die vollständige Reaktion zu einem neuen, deutlich polarerem Produkt an. Dies war unerwartet, weil DEACM-Aldehyd **54** einen deutlich höheren  $R_f$ -Wert aufweist als sein Enamin-Vorläufer **53**. Mit dem Rohprodukt **59** wurde daraufhin eine Reduktion mit Natriumborhydrid in Ethanol zum Thiocumarin-Alkohol **61** versucht. Durch qualitative Dünnschichtchromatographie konnte an dieser Stelle geschlussfolgert werden,

dass an Stelle des Thiocumarin-Alkohols **61** das DEACM-OH **62** gebildet wurde. Dies bedeutete gleichzeitig, dass die Thioketon-Funktionalität offensichtlich unter den oxidativen Bedingungen des Natriumperiodats einen Schwefel-Sauerstoff-Austausch einging. Da im Zuge der später vorgesehenen Oligonukleotid-Festphasensynthese mit Thiocumarin-geschützten Nucleosiden ebenfalls eine Iod-Oxidation vollzogen wird, musste an dieser Stelle zunächst die generelle Kompatibilität des Thiocumarins in Frage gestellt werden.



**Abb. 34** Syntheseroute zur Darstellung der Thio-DEACBY-Schutzgruppe **60**

Mit Hilfe von qualitativer Dünnschichtchromatographie (DC) wurde eine Probe von Thiocumarin-Alkohol **61** für unterschiedliche Zeitintervalle den Oxidationsbedingungen der Festphasensynthese ausgesetzt. Es wurde sowohl eine für ABI-Synthesizer (0,02 M Iod in 90,54:9,05:0,41 THF/H<sub>2</sub>O/Pyridin (v/v/v)) als auch eine für ÄKTA-Synthesizer (0,05 M Iod in 9:1 Pyridin/H<sub>2</sub>O (v/v)) optimierte kommerzielle Oxidizer-Lösung mit je 0,01 M Thiocumarin angesetzt und über eine Inkubationszeit von maximal zehn Minuten die Fluoreszenz der DC-Banden beobachtet. Dabei zeigte sich, dass bereits direkt zu Beginn der Messung ( $t \approx 0$  min.) kein Thiocumarin-OH **61**, dafür aber eine vollständige Umsetzung zu DEACM-Alkohol **62** auf der DC-Platte nachweisbar war. Leider musste auch festgestellt werden, dass sich Thiocumarin-OH **61** selbst unter Kühlung in wässriger Lösung allmählich zu DEACM-Alkohol **62** umlagert. Trotz der zunächst vielversprechenden Ergebnisse in den Arbeiten von Jullien *et*

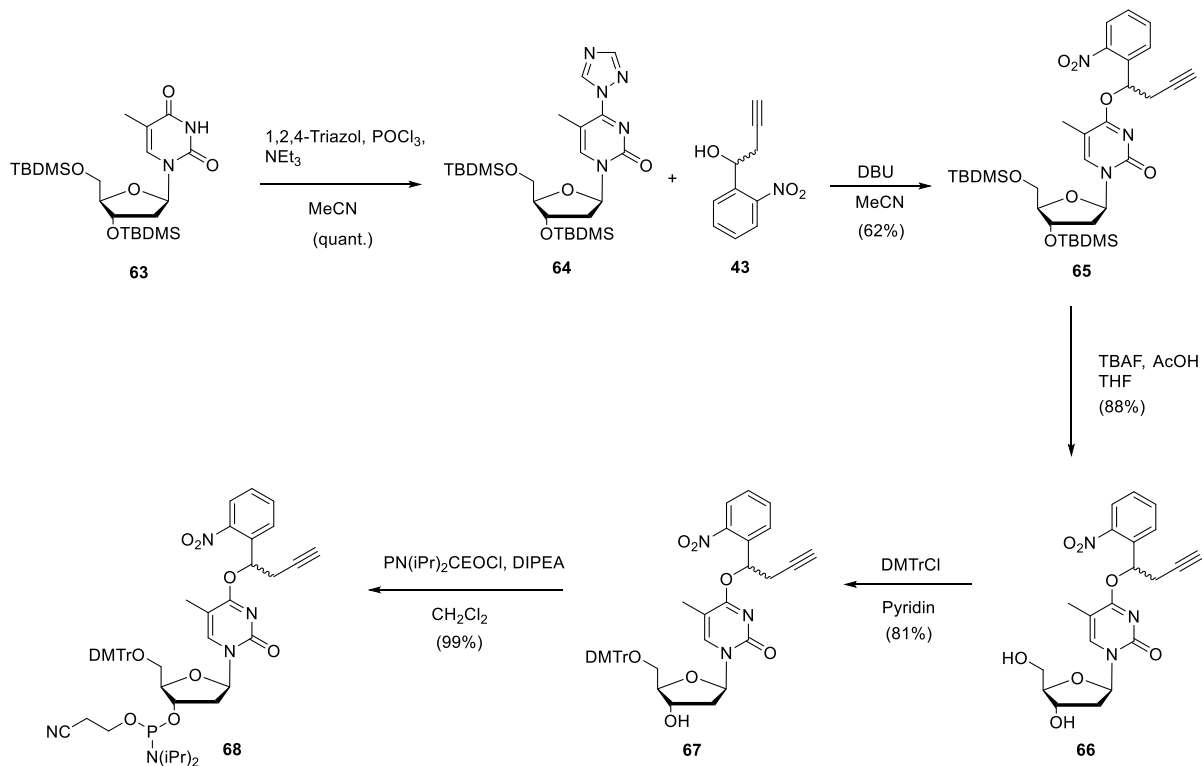
al. wurde auf Grundlage der Stabilitätstests beschlossen, die Alkinylierung des Thiocumarins für eine spätere Oligonukleotidzyklisierung nicht weiter zu verfolgen.

### 3.2 Synthese Alkin-modifizierter photolabiler DNA-Phosphoramidite

Für die Zyklisierung photoaktivierbarer Oligonukleotide mussten zunächst Phosphoramidit-Bausteine hergestellt werden, die an den Nucleobasen photolabil geschützt sind. Um für spätere Anwendung Oligonukleotidsequenzen an beliebigen Positionen der Sequenz zyklisieren zu können, müssen Alkin-modifizierte photolabil geschützte Phosphoramidite aller kanonischen Nucleobasen hergestellt werden. Die Modifikationen werden dabei an Thymin an  $O^4$ -, Guanosin an  $O^6$ -, Cytidin an  $N^4$ - und Adenosin an  $N^6$ -Position angebracht.

#### 3.2.1 Synthese des NPBY-geschützten Thymin-Phosphoramidits

Die Synthese des NPBY-geschützten Thymin-Phosphoramidits wurde ausgehend von 3'-O-, 5'-O-TBDMS-geschütztem Thymin **63** durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die  $O^4$ -Position der Nucleobase mit Phosphorylchlorid und 1,2,4-Triazol zum Derivat **64** aktiviert. Im darauffolgenden Schritt wurde mit Hilfe der nicht-nucleophilen Base 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) die NPBY-Schutzgruppe in guter Ausbeute von 62% an die Nucleobase geknüpft.



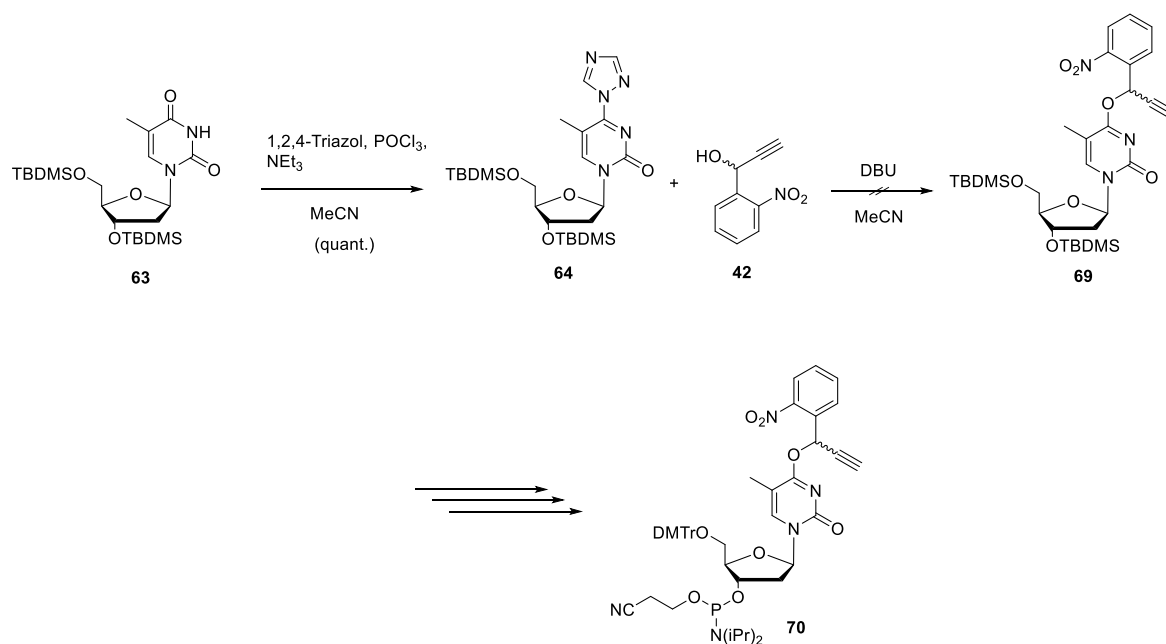
**Abb. 35** Syntheseroute zur Darstellung des NPBY-geschützten Thyminphosphoramidits **68**



Anschließend wurden die TBDMS-Schutzgruppen mittels TBAF-Reagenz und Essigsäure abgespalten. Thymidin-Derivat **66** wurde daraufhin mit Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl) in Pyridin selektiv an 5'-O-Position geschützt und Verbindung **67** schließlich durch Reaktion mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-Diisopropylchlorphosphoramidit in nahezu quantitativer Ausbeute zum Phosphoramidit **68** umgesetzt. Die Gesamtausbeute der Synthese von **67** über fünf Schritte ist mit knapp 44% sehr zufriedenstellend.

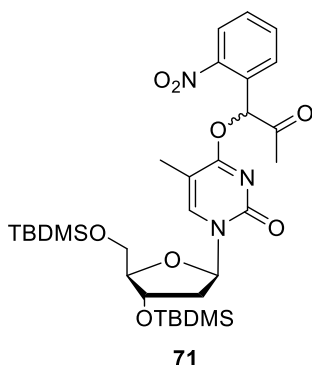
### 3.2.2 Synthese des NPPY-geschützten Thymidin-Phosphoramidits

Für die Synthese eines NPPY-geschützten Thymidin-Phosphoramidits wurde eine zum NPBY-Derivat analoge Syntheseroute verfolgt (Abbildung 36). Der entscheidende Schritt, die Kupplung der photolabilen Alkin-modifizierten NPPY-Schutzgruppe **42** an Triazol-aktiviertes Thymidin **64** schlug jedoch fehl. Neben Resten von Startmaterial konnte bei dieser Reaktion ein Hauptprodukt mit einer Ausbeute von 43% isoliert werden. Dieses zeigte in der Massenspektrometrie eine gegenüber Zielprodukt **69** um +18 Da erhöhte Molekülmasse. Des Weiteren konnte für das Reaktionsprodukt mit Hilfe von  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-NMR-Experimenten die Entstehung einer Kopplungs-isolierten Methylgruppe nachgewiesen werden.



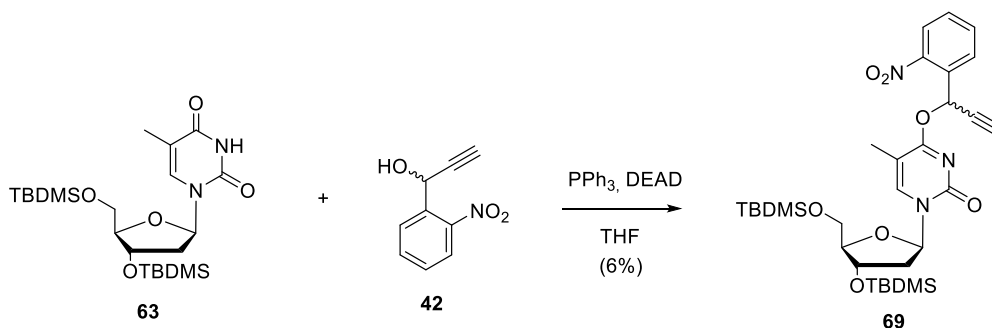
**Abb. 36** Geplante Syntheseroute zur Darstellung des NPPY-geschützten Thymidinphosphoramidits **70**

Es wurde daher geschlussfolgert, dass unter den Reaktionsbedingungen der Kupplung bzw. im Zuge der Aufarbeitung formal ein Wassermolekül an die Dreifachbindung addiert. Das daraus resultierende Enol tautomerisiert daraufhin zum Methylketon **71** um (Abbildung 37).



**Abb. 37** Struktur des Reaktionsprodukts der Kupplungsreaktion von NPPY **42** an 1,2,4-Triazol-aktiviertes Thymidin **64**

Es ist hierbei anzumerken, dass derartige Alkinhydratisierungen laut Literatur nur mit Hilfe von Katalysatoren wie  $\text{Hg}^{2+}$  im sauren Milieu stattfinden. Um den möglichen Einfluss des Lösungsmittels (sowie durch Restmengen an Wasser) zu untersuchen, wurde die Reaktion in DMF, mit und ohne zusätzliche Hünig-Base wiederholt. In beiden Fällen konnte lediglich Verbindung **71** isoliert werden. Schließlich wurde eine Mitsunobu-Reaktion zwischen TBDMS-geschütztem Thymidin-Vorläufer **63** und der NPPY-Schutzgruppe **42** versucht (Abbildung 38). Zwar wurde auch hier mit 40% Ausbeute Verbindung **71** als Hauptprodukt erhalten, jedoch konnten auch 6% der gewünschten Verbindung **69** isoliert und charakterisiert werden.



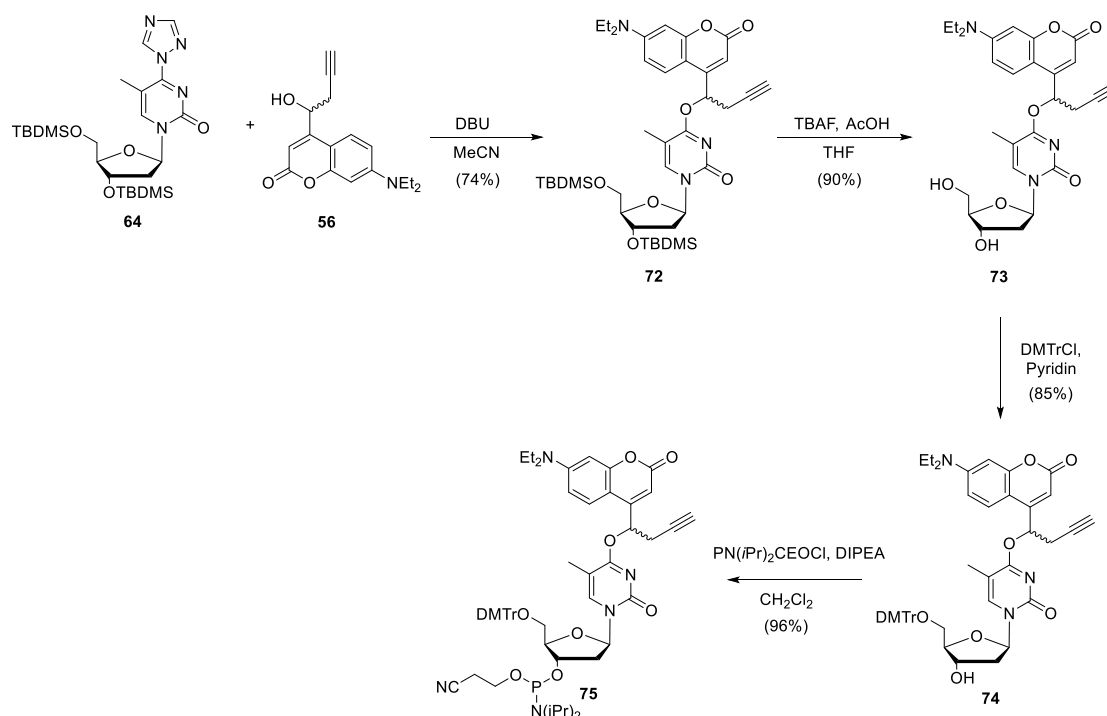
**Abb. 38** Kupplung der NPPY-Schutzgruppe **42** mit TBDMS-geschütztem Thymidin **63** über eine MITSUNOBU-REAKTION.

Das Motiv der direkten Alkin-Verknüpfung ( $n = 0$ ) an die benzyliche Position der Nitrobenzyl-Schutzgruppe erwies sich zusammenfassend jedoch als äußerst labil. Da im weiteren Verlauf der Synthese bis hin zum fertigen Oligonukleotid noch einige harsche Reaktionsbedingungen folgten, wurde die Synthese eines NPPY-geschützten Thymidinphosphoramidits an dieser Stelle vorerst angehalten. Die analoge NPBYSchutzgruppe mit einer Methylen-Einheit als Abstandhalter zur benzylichen Position ( $n = 0$ ) zeigte im Gegensatz zu NPPY volle Stabilität während der Synthese zum Phosphoramidit und, wie sich im weiteren Verlauf der Arbeit zeigen sollte, ebenfalls während der Festphasensynthese von Oligonukleotiden. Die Zyklisierung von

Oligonukleotiden mit Hilfe NPPY-geschützter Nucleobasen war aus diesem Grund letztendlich nicht mehr notwendig.

### 3.2.3 Synthese des DEACBY-geschützten Thymidin-Phosphoramidits

Die Synthese des DEACBY-geschützten Thymidin-Phosphoramidits **75** verlief analog zur Darstellung des NPBY-geschützten Thymidin-Phosphoramidits **68** beginnend mit 1,2,4-Triazol aktiviertem Thymidinbaustein **64**. Der DEACBY-Alkohol wurde mit Hilfe von DBU in einer guten Ausbeute von 74% an die Nucleobase geknüpft. Im Anschluss daran wurden die 3'-O- und 5'-O-TBDMS-Schutzgruppen unter Verwendung von TBAF-Reagenz entfernt. Es folgte die selektive Verknüpfung der DMTr-Schutzgruppe in 5'-O-Position mit guten Ausbeuten von 85%.

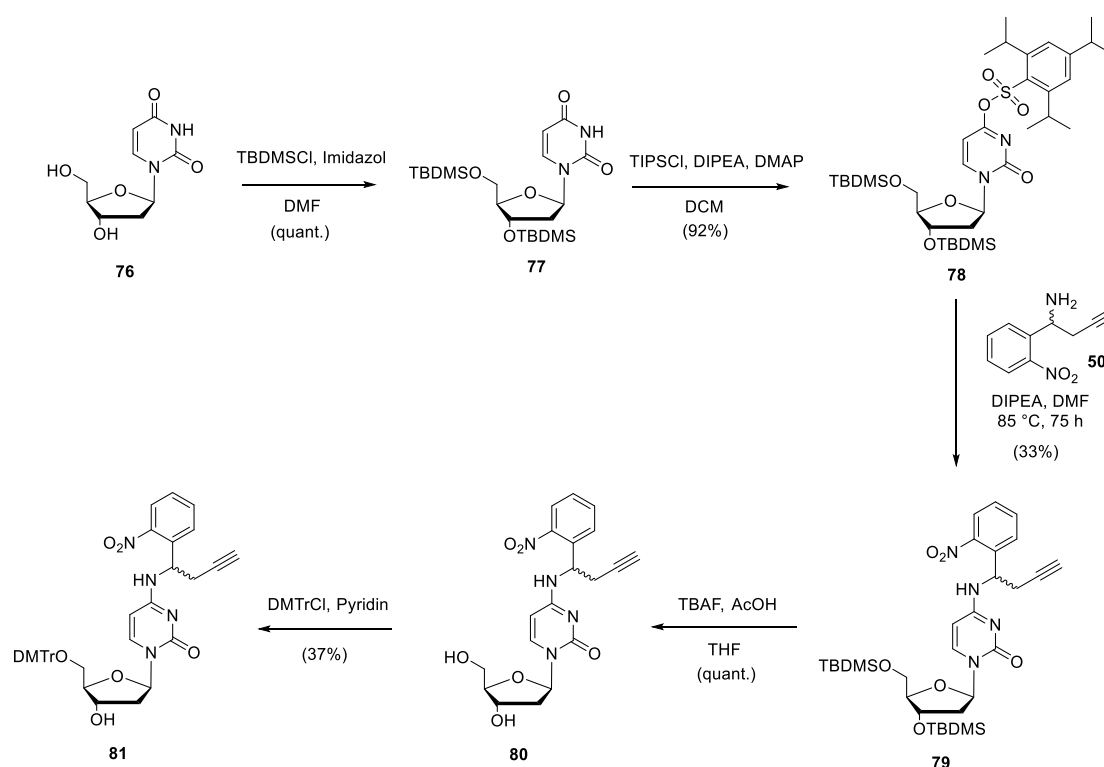


**Abb. 39** Syntheseroute zur Darstellung des DEACBY-geschützten Thymidin-Phosphoramidits **75**

Zuletzt wurde Verbindung **74** zum Phosphoramidit-Derivat umgesetzt, wobei ebenfalls sehr hohe Reaktionsausbeuten erzielt wurden. Die Gesamtausbeute über fünf Reaktionsschritte (beginnend bei Thymidin-Baustein **63**) lag somit bei 54% und ist damit um 10% effizienter als die Synthese des NPBY-geschützten Thymidin-Phosphoramidits **68**.

### 3.2.4 Synthese der NPBY-geschützten Desoxycytidin-Derivate

Die Synthese des NPBY-geschützten Desoxycytidin-Derivats (und Teile des in Kapitel 3.2.5 folgenden Desoxyadenosin-Derivats) wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Anja Blümner, B. Sc. durchgeführt. Hierbei wurde von Desoxyuridin **76** ausgegangen. Im ersten Schritt der Synthese wurden an 3'-O- und 5'-O-Position TBDMS-Schutzgruppen eingeführt. Der geschützte Desoxyuridin-Baustein **77** wurde anschließend durch Reaktion mit Triisopropylbenzylsulfonchlorid (TIPSCI) mit DIPEA und DMAP mit einer Ausbeute von 92% an Position O<sup>4</sup> aktiviert. Der aktivierte Zucker **78** wurde daraufhin mit dem Amino-NPBY **50** und DIPEA umgesetzt.



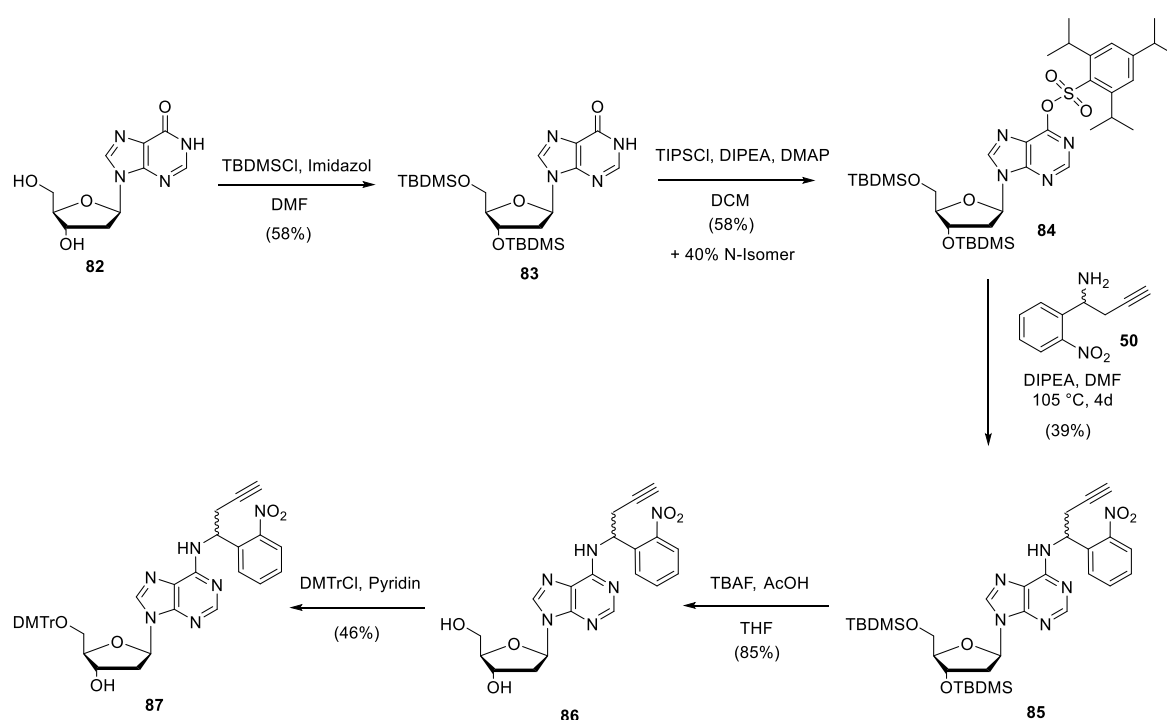
**Abb. 40** Syntheseroute zur Darstellung des NPBY-geschützten Desoxycytidin-Derivats **81**

Die Reaktion verlief bei Raumtemperatur sehr langsam und auch durch Erhitzen auf 85 °C für ca. 3 Tage und erneute Zugabe von 0,5 eq. DMAP konnten schließlich nur typische Reaktionsausbeuten zwischen 25 und 33% erzielt werden. Als mögliche Ursache könnte hier der sterische Anspruch sowohl der TIPS-Abgangsgruppe, als auch des sekundären NPBY-Amins eine Rolle spielen. Das NPBY-geschützte Desoxycytidin-Derivat wurde daraufhin mit TBAF-Reagenz versetzt, um die TBDMS-Schutzgruppen abzuspalten. Im letzten Schritt wurde an 5'-O-Position die DMTr-Schutzgruppe angebracht und das NPBY-geschützte Desoxycytidin-Derivat **81** mit einer mäßigen Ausbeute von 37% erhalten. Die Gesamtausbeute über fünf Stufen beläuft sich bei dieser Syntheseroute auf 11%. Da im weiteren Verlauf der

Arbeit ein NPHY-geschütztes Desoxycytidin-Derivat nicht für die Oligonukleotidsynthese verwendet wurde, endete die Syntheseroute hier mit der langfristig lagerbaren Verbindung **81**.

### 3.2.5 Synthese der NPHY-geschützten Desoxyadenosin-Derivate

Die Synthese des NPHY-geschützten Desoxyadenosin-Derivats **87** verlief (zum Teil im Rahmen der Bachelorarbeit von Anja Blümner) analog zur Synthese des entsprechend geschützten Desoxycytidin-Derivats **81** (Kapitel 3.2.4) und begann beim Desoxyinosin-Baustein **82**. Im ersten Schritt wurden an 3'-O- sowie an 5'-O-Position TBDMS-Schutzgruppen angebracht. Daraufhin folgte die Aktivierung des Inosin-Bausteins in O<sup>6</sup>-Position durch TIPS mit Hünig-Base und DMAP als Katalysator.

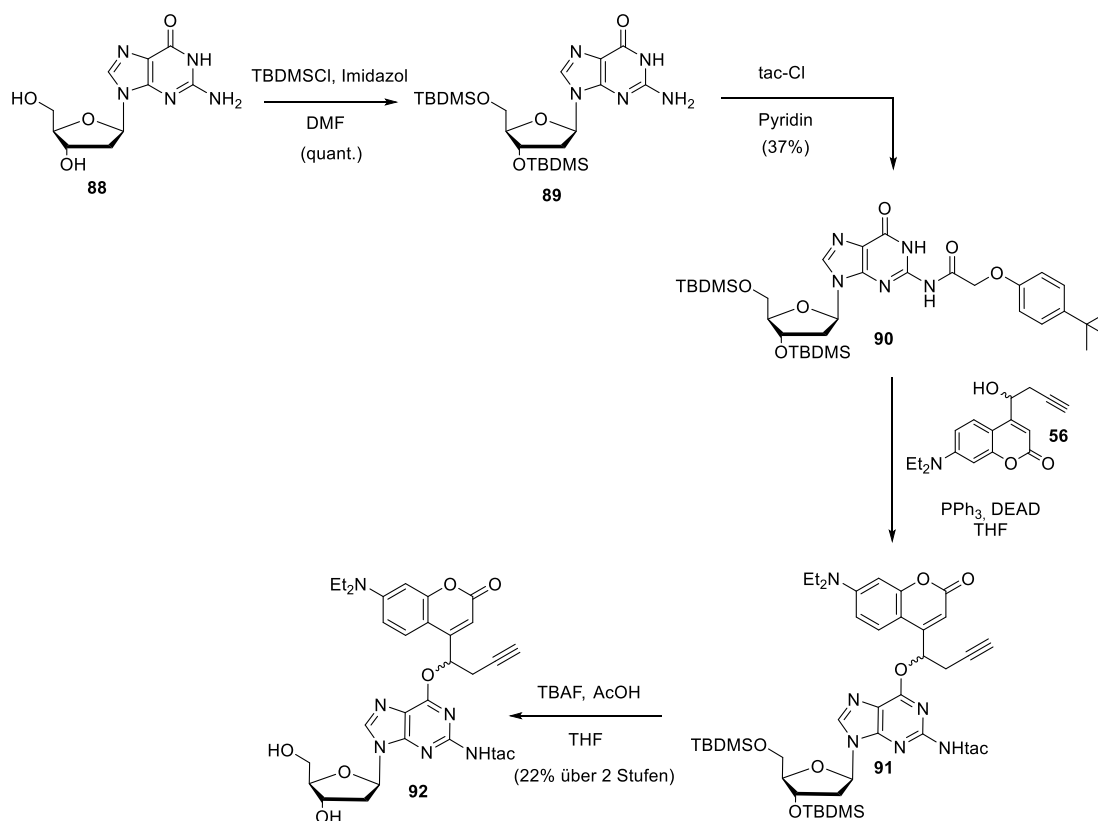


**Abb. 41** Syntheseroute zur Darstellung des NPHY-geschützten Desoxyadenosin-Derivats **87**

Die Reaktion ist hierbei nur wenig regioselektiv, neben dem erwünschten O-Isomer **84** mit 58% Ausbeute entsteht außerdem das nicht benötigte N-Isomer in hohen Ausbeuten von 40%. Die darauffolgende Kupplung zwischen aktiviertem Inosin **84** und dem Amino-NPHY-Derivat **50** bei erhöhter Temperatur und langer Reaktionsdauer lieferte, wie im Falle des Desoxycytidin-Derivats, nur eine mäßige Ausbeute von 39%, was auch hier wahrscheinlich dem sterischen Anspruch der beiden Reaktionspartner zuzuschreiben ist. Das photolabil geschützte Adenosin-Derivat **85** wurde im nächsten Schritt zur Abspaltung der TBDMS-Gruppen mit TBAF-Reagenz versetzt. In diesem Fall konnte das Reaktionsprodukt **86** nur mit TBAF-Verunreinigung isoliert werden und wurde so im darauffolgenden Schritt mit DMTr-Chlorid weiter umgesetzt. Das Schützen der 5'-O-Position gelang dabei mit einer mäßigen Ausbeute

von 46%. Die Gesamtausbeute der Synthese von NPBY-geschütztem Desoxyadenosin-Derivat **87** über fünf Reaktionsschritte liegt somit bei ca. 5%. Da im weiteren Verlauf der Arbeit ein NPBY-geschütztes Desoxyadenosin-Derivat nicht für die Oligonukleotidsynthese verwendet wurde, endete die Syntheseroute hier mit der langfristig lagerbaren Verbindung **87**.

### 3.2.6 Synthese der DEACBY-geschützten Desoxyguanosin-Derivate



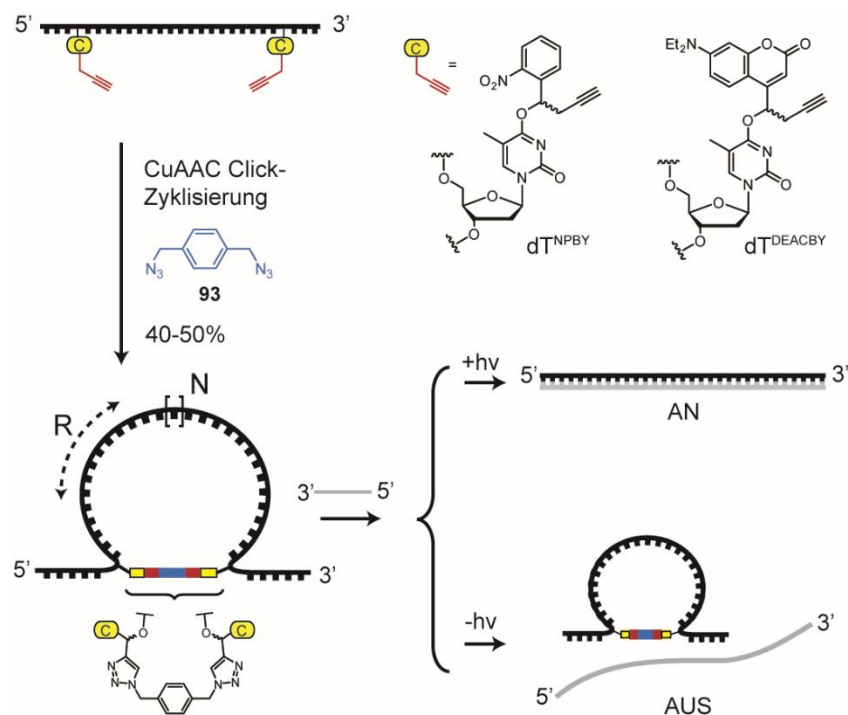
**Abb. 42** Syntheseroute zur Darstellung des NPBY-geschützten Desoxyguanosin-Derivats **92**

Die Synthese des DEACBY-geschützten Desoxyguanosin-Derivats **92** geht von Desoxyguanosin **88** aus und beinhaltet zunächst das Anbringen der TBDMS-Schutzgruppen in 3'-O- und 5'-O-Position. Die Umsetzung erfolgte hier ohne weitere Aufarbeitung durch Kristallisation aus Ethanol. Daraufhin wurde die exozyklische Amino-Funktion mit einer *tert*-Butylphenoxycarbonyl-Schutzgruppe (tac) versehen. Die mäßige Ausbeute von 37% ist vermutlich auf Reste an Ethanol und damit auf eine Deaktivierung des tac-Säurechlorids zurückzuführen. Die darauffolgende Kupplung der NPBY-OH Schutzgruppe **43** erfolgt über eine MITSUNOBU-REAKTION. Das Produkt **91** wird zusammen mit dem Hydrazin-Produkt des DEAD-Reagenzes isoliert und direkt weiter mit TBAF-Reagenz umgesetzt. Die Ausbeuten des NPBY-geschützten Guanosin-Derivats **92** liegen dabei bei 22% über zwei Stufen.

### 3.3 Photoaktivierbare zyklisierte Oligonukleotide (Watson-Crick-Basenseite)

#### 3.3.1 Einleitung

Wie in Kapitel 1.2.2 und Kapitel 1.2.3 detailliert beschrieben, werden photoaktivierbare Oligonukleotide für das Schalten biologischer Prozesse verwendet. In den bisherigen Strategien zum Aufbau photoaktivierbarer Oligonukleotide wurden photolabile Schutzgruppen zumeist an den Nucleobasen verknüpft, sodass die Watson-Crick-Basenpaarung lokal blockiert wird. In vielen Experimenten konnte jedoch keine gute An-/Aus-schalt-Effizienz erreicht werden, sodass entweder zu Beginn noch eine Restaktivität des zu deaktivierenden Prozesses vorhanden war oder, bei Einbau multipler photolabiler Schutzgruppen innerhalb der Oligonukleotid-Sequenz, nach Belichten die Aktivität nicht vollständig wiederhergestellt werden konnte. Die End-zu-End-Zyklisierung von Oligonukleotiden ist eine neue Strategie, bei der die Duplex destabilisierende Wirkung auf einer ungünstigen Konformation des Oligonukleotid-Einzelstrangs beruht. Innerhalb eines Größenbereichs eingeschlossener Nucleotide führt die Ringspannung dazu, dass kein stabiler Duplex ausgebildet werden kann.



**Abb. 43** Schema der Zyklisierung von Oligonukleotiden über eine postsynthetische CuAAC-Reaktion. Der zweifach Alkin-modifizierte und photolabil geschützte Strang wird dabei mit einem Bisazid-Linker in eine intrasequenzielle zyklische Konformation überführt. Dieser kann aufgrund der hohen Ringspannung innerhalb einer bestimmten Ringgröße  $R$  vom Gegenstrang nicht gebunden werden. Durch Belichten wird der photolabile Linker („photo-tether“) spurenfrei entfernt und es bildet sich eine stabile Doppelhelixstruktur aus.

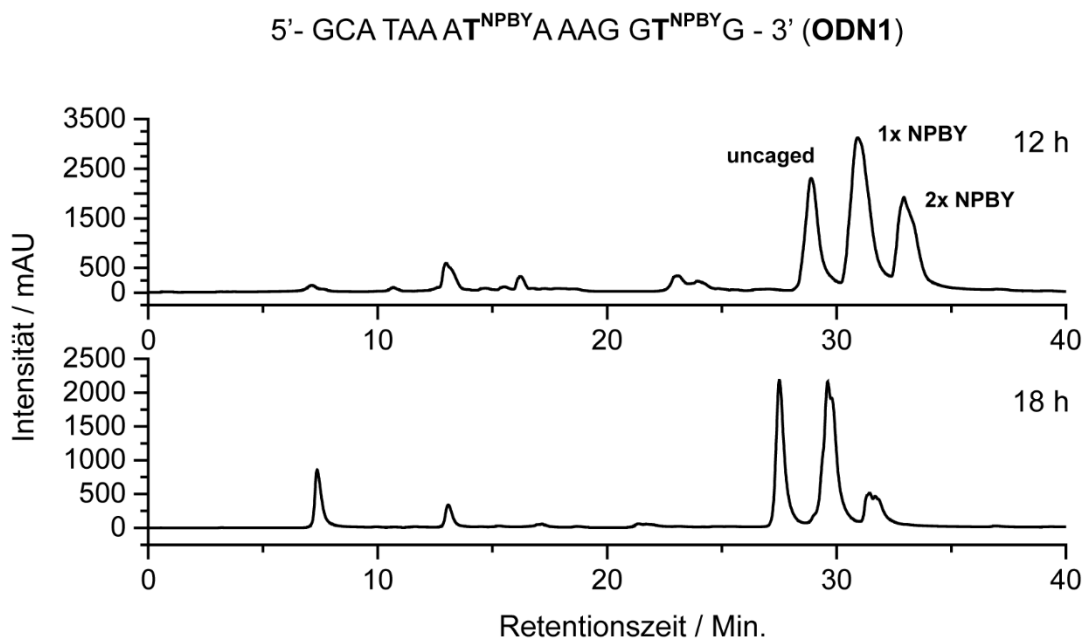
Der Ansatz eignet sich damit besonders für kurze funktionelle Oligonukleotide, wie beispielsweise Antisense-Oligonukleotide für mRNA, miRNA, siRNA usw.. Für längere funktionelle Oligonukleotide wie Aptamere eignet sich die End-zu-End-Zyklisierung jedoch nicht, da die entsprechenden Ringgrößen die Ausbildung einer stabilen Doppelhelixstruktur nicht verhindern. Mit den im Vorabschnitt hergestellten Alkin-funktionalisierten Schutzgruppen NPBY und DEACBY ist es nun möglich, „Ankerpunkte“ für eine Zyklisierung an beliebiger Position innerhalb der Oligonukleotidsequenz zu setzen (Abbildung 43). Mittels postsynthetischer CuAAC-Reaktion mit einem Bisazid-Linker kann das lineare Oligonukleotid dann in intrasequentielle zyklische Konformationen überführt werden, wodurch eine effiziente Photoaktivierung von längeren Oligonukleotiden ermöglicht werden sollte. Die Entwicklung einer solchen Zyklisierungsreaktion, die Untersuchung und die systematische Optimierung der damit einhergehenden Duplex destabilisierenden Eigenschaften, sowie der photochemischen Eigenschaften und schließlich die Anwendung im biologischen Kontext des C10 Aptamers sind Gegenstand des folgenden Abschnittes.

### 3.3.2 Darstellung und Zyklisierung der Benchmark-Oligonukleotide

Um den Einfluss verschiedener photolabiler Schutzgruppen auf die Duplexstabilität zu untersuchen und zu vergleichen, werden diese im Arbeitskreis Heckel üblicherweise zunächst in eine einheitliche Oligonukleotidsequenz eingebaut. Dieses als „Benchmark-Sequenz“ bezeichnete Oligonukleotid besteht aus 15 Nukleotiden (5'-GCA TAA AXA AAG GTG-3') und besitzt normalerweise im Zentrum das photolabil geschützte Nukleotid **X**. Als erstes Modellsystem für die Entwicklung und Untersuchung zyklisierter Oligonukleotide wurde ebenfalls die Benchmark-Sequenz gewählt und, wie weiterführend gezeigt werden wird, einige wichtige Erkenntnisse für die spätere Anwendung in langen funktionellen Oligonukleotiden gesammelt. Mittels Festphasensynthese wurde im ersten Schritt unter Verwendung von Thymidin-Phosphoramidit **68** das Oligodesoxynukleotid **ODN1** hergestellt, welches an Position 7 und 14 jeweils mit einem dT<sup>NPBY</sup>-Baustein modifiziert ist. Für die Festphasensynthese wurde an dieser Stelle eine Standardschutzgruppenstrategie für die exozyklischen Nukleobasen gewählt (dG<sup>DMF</sup>, dA<sup>Bz</sup>, dC<sup>Ac</sup>), wobei die Schutzgruppen üblicherweise durch Inkubation mit 32%-iger NH<sub>3</sub>-Lösung über Nacht bei Raumtemperatur entfernt werden. Eine lange Inkubationszeit in Ammoniak stellte sich jedoch als ungeeignet heraus. Zwar wurden die exozyklischen Aminoschutzgruppen vollständig entfernt, gleichzeitig wurden jedoch ebenfalls die photolabilen Modifikationen am Thymidin abgespalten. Die rasche Hydrolyse von photolabil geschützten Thymidin-Derivaten ist kein neues Phänomen. So wurde u.a. in der Doktorarbeit von Dr. Timo Mack NDBF-geschütztes Thymidin nur mit Mühe und in geringen Mengen an fertig aufgereinigten Oligonukleotiden erhalten. Selbst unter UltraMILD®-Abspaltbedingungen (10 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in Methanol) wurden nach nur 10 Minuten Inkubationszeit lediglich 30% intakte NDBF-Schutzgruppen am Thymidin vorgefunden. Die



Entschützungs kinetik von NPBY-geschütztem Thymidin in **ODN1** im basischen Milieu verläuft im Gegensatz dazu deutlich langsamer. So kann nach 18 Stunden immer noch 16% vollständig photolabil geschütztes Oligonukleotid (2 NPBY-Modifikationen) isoliert werden (Abbildung 44). Eine Verkürzung der Inkubationszeit auf 12 Stunden erhöht diesen Anteil auf 28%.



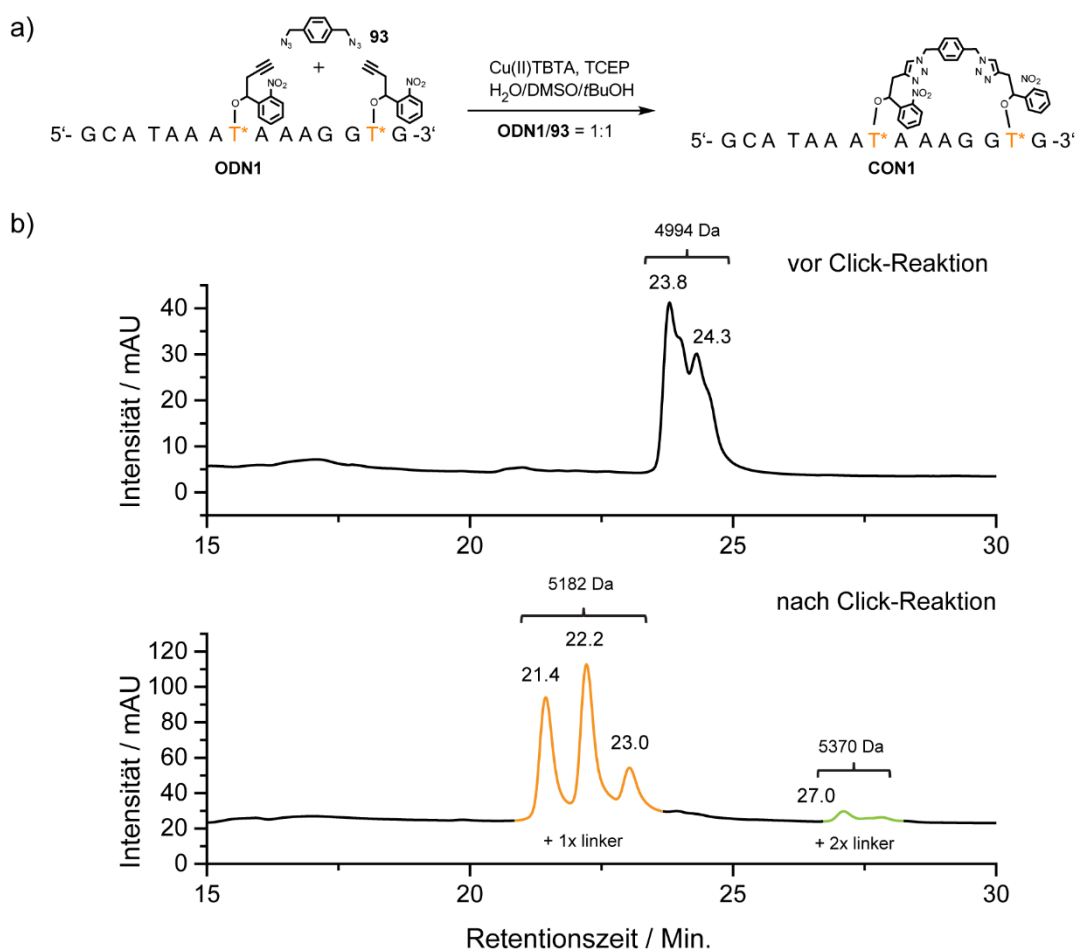
**Abb. 44** RP-HPLC-Chromatogramm nach Inkubation von **ODN1** mit 32%-iger  $\text{NH}_3$ -Lösung. Die NPBY-Schutzgruppe wird unter basischen Bedingungen allmählich abgespalten.

Für die folgenden Oligonukleotidsynthesen wurde daher geschlossen, dass eine UltraMILD<sup>®</sup>-Strategie (z.B.  $\text{dG}^{\text{iPrPac}}$ ,  $\text{dA}^{\text{Pac}}$ ,  $\text{dC}^{\text{Ac}}$ ) mit kurzen  $\text{NH}_3$ -Inkubationszeiten nicht nur sinnvoll, sondern auch notwendig für die Herstellung größerer Mengen photoaktivierbarer zyklischer Oligonukleotide sein wird.

Nach Abspaltung der endständigen DMTr-Schutzgruppe und anschließende RP-HPLC-Aufreinigung wurde das fertige **ODN1** für erste Zyklisierungsexperimente verwendet. Seela *et al.* berichteten bereits 2010 von einer CuAAC Crosslinking-Reaktion zwischen Alkin-modifizierten Purinderivaten zweier DNA Einzelstränge und einem Bisazid-Linker.<sup>[125]</sup> Die große Herausforderung einer solchen Reaktion besteht darin, sowohl die vielfach negativ geladenen Oligonukleotid-Stränge, als auch den unpolaren Bisazid-Linker, sowie den CuTBTA-Komplex und das Reduktionsmittel während der Reaktion in Lösung zu halten. Das Seela-Protokoll verwendet hierzu ein finales Lösungsmittelgemisch aus Wasser, DMSO, *tert*-Butanol und Dioxan. Dem Protokoll gemäß wird der Cu(II)TBTA-Komplex in Wasser/DMSO/*tert*-Butanol 4:3:1 vorgelegt und das Oligonukleotid in Wasser gelöst hinzugegeben. Daraufhin wird eine wässrige TCEP-Lösung hinzugefügt, um Cu(II)TBTA zum

reaktiven Cu(I)TBTA zu reduzieren. Es folgt die Zugabe einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung und schließlich des Bisazid-Linkers, gelöst in Wasser/Dioxan 1:1. Schließlich wird die Lösung mit einem weiteren Äquivalent DMSO verdünnt.

Unter Verwendung dieses Protokolls wurden 2,5 nmol von **ODN1** mit Bisazid **93** zur Reaktion gebracht. Eine niedrige Gesamtkonzentration von Oligonukleotid und Bis-Azid-Linker (jeweils 76  $\mu\text{M}$ ) sollte hierbei die intramolekulare Zyklisierungsreaktion gegenüber einer intermolekularen Verknüpfung begünstigen (ZIEGLER-RUGGLI-VERDÜNNUNGSPRINZIP). Außerdem wurde eine 1:1-Stöchiometrie der beiden Reaktanten gewählt, damit eine Zweifachaddition des Linkers an das Oligonukleotid anstelle der Zyklisierung statistisch unterdrückt wird.

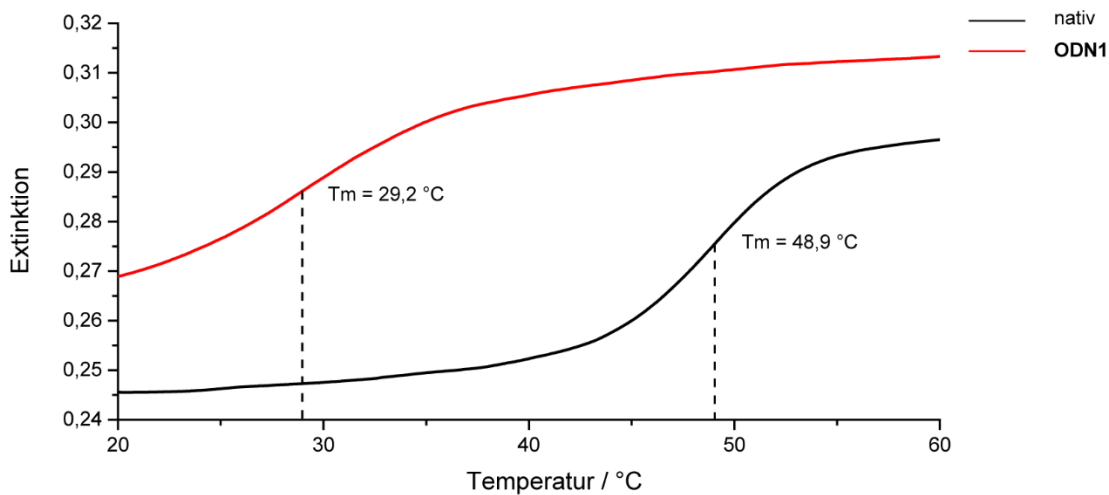


**Abb. 45** (a) Zyklisierung des Benchmark-Oligonukleotids **ODN1** über eine CuAAC-Reaktion mit dem Bisazid-Linker **93** zum zyklisierten Oligodesoxynukleotid (CON) **CON1**. (b) RP-HPLC-Chromatogramme vor und nach der Click-Reaktion.

Das Reaktionsgemisch wurde für 21 Stunden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß geschüttelt und dann über Vakuumzentrifugation von allen Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und dann direkt mittel RP-HPLC aufgereinigt. In Abbildung 45b sind die HPLC-Spektren vor und nach der Click-Reaktion abgebildet. **ODN1** wird hier als ein breiter Peak zwischen 23 und 25 Minuten erhalten. Beim genaueren Betrachten können hier vier

Einzelpeaks beobachtet werden, die den vier möglichen Diastereomeren von **ODN1** zugeordnet werden können. Das Auftreten eines Diastereomeregemisch wiederum resultiert aus den chiralen Zentren, die sich an den zwei eingebauten NPBY-Schutzgruppen in **ODN1** befinden. Nach der Click-Reaktion ist **ODN1** vollständig verbraucht und es tritt ein Satz von Signalen mit früherer Elutionszeit (21-23 Minuten) auf, sowie ein Satz von Signalen mit niedriger Intensität und späterer Elution (ca. 27 Minuten). Die massenspektrometrische Untersuchung der isolierten Oligonukleotid-Produkte zeigte, dass alle Einzelpeaks der frühen Elutionszeit die Masse 5182 Da, die spätere Fraktion die Masse von 5370 Da besitzt. Die Differenz zur Masse des Startmaterials **ODN1** (4994 Da) ist dabei jeweils ein Vielfaches der Bisazid-Linker Masse (188 Da). Die späte Fraktion kann deshalb einer Doppeladdition des Bisazid-Linkers zugeordnet werden, wodurch das entsprechende Oligonukleotid nicht zyklisiert wurde. Die Verschiebung der Elution zu späteren Retentionszeiten ist dabei im Einklang mit der Tatsache, dass durch den Bisazid-Linker jeweils ein unpolarer Rest an das Oligonukleotid hinzugefügt wird, der mit dem RP-Material der HPLC-Säule stark wechselwirkt. Interessanterweise weisen die Peaks, denen eine Einfachaddition des Linkers zugeordnet werden kann, trotz eines zusätzlichen unpolaren Rests eine frühere Retention als das Startmaterial auf. Da ein solches Verhalten zyklischer Oligonukleotide in der RP-HPLC zuvor bereits von Morvan *et al.* berichtet worden war<sup>[115]</sup>, konnte dies als starker Hinweis auf das Vorliegen zyklisierter Oligonukleotidspezies (jeweils Diastereomere des **CON1**) gewertet werden.

Für das weitere Vorgehen wäre es nun notwendig gewesen, eine ausreichende Menge Material an **CON1** herzustellen für Schmelzpunktstudien, photochemische Charakterisierung und nicht zuletzt einen eindeutigen Nachweis der Zyklisierung. Allerdings konnten über das Seela-Protokoll lediglich Produktmengen zwischen 30-50 pmol isoliert werden, was einer unbefriedigenden Ausbeute von 1-2% entspricht. Bemerkenswerterweise konnte jedoch auch kein Startmaterial **ODN1** mehr über RP-HPLC beobachtet werden, woraus sich an dieser Stelle die Frage nach dem Verbleib der DNA ergab. Wie in den folgenden Abschnitten an Hand einer verbesserten Oligonukleotid-Sequenz ausführlich erläutert werden wird, würden systematisch die Parameter der Reaktionsführung sowie der Aufarbeitung variiert werden, um ein zuverlässiges Zyklisierungsprotokoll mit guten Produktausbeuten zu erhalten. **ODN1** bzw. **CON1** erwies sich jedoch aus einem anderen Grund als ein ungeeignetes Modellsystem für die Entwicklung und Charakterisierung photoaktivierbarer, zyklischer Oligonukleotide. Parallel zu den zuvor beschriebenen Zyklisierungsexperimenten wurde eine Schmelzpunktstudie mit **ODN1** durchgeführt, also der Duplex-destabilisierende Effekt bei Einbau der zwei NPBY-Modifikationen untersucht.



**Abb. 46** Temperaturabhängige UV/Vis-Spektroskopie (Schmelzpunktstudien) der nativen Benchmarksequenz (schwarz) und des zweifach NPB Y-modifizierten **ODN1**

Dabei wird die Absorption einer Oligonukleotid-Probe (hier 1  $\mu\text{M}$  Strang und 1  $\mu\text{M}$  Gegenstrang in 1x PBS-Puffer) in Abhängigkeit der Temperatur gemessen. Die Änderung der Absorption als Funktion der Temperatur beruht auf der Tatsache, dass doppelsträngige DNA einen niedrigeren molaren Extinktionskoeffizienten als einzelsträngige DNA besitzt. Da im Zuge der Temperaturerhöhung doppelsträngige DNA in einzelsträngige übergeht (Schmelzen von DNA) steigt gleichermaßen die Absorption der Probe (auch als Hyperchromizität bezeichnet). Die sich daraus ergebende Schmelzkurve hat einen sigmoidalen Verlauf. Die Temperatur, bei der jeweils die Hälfte der doppelsträngigen DNA in den Einzelstrang übergegangen ist, bezeichnet man als Schmelztemperatur  $T_m$ . Wird der DNA-Duplex durch Einbau photolabiler Schutzgruppen destabilisiert, so äußert sich dies in einem erniedrigten Schmelzpunkt. Die Benchmark-Sequenz weist bei der vorgelegten DNA- und Pufferkonzentration einen Schmelzpunkt von 48,9 °C auf. Allein durch den Einbau der beiden NPB Y-Modifikationen erniedrigt sich der Schmelzpunkt im Falle von **ODN1** bereits um ca. 20 °C auf einen Wert von 29,2 °C. Eine zusätzliche Duplexdestabilisierung infolge einer Zyklisierungsreaktion wäre nun schwer zu quantifizieren und zu optimieren, da der temperaturabhängigen UV/Vis-Spektroskopie mit dem verwendeten Spektrometer technisch etwa bei 10 °C eine untere Grenze gesetzt ist. Für die Auswertung der Schmelzpunktkurven ist es jedoch notwendig, ausreichend Messpunkte der Basislinien oberhalb und unterhalb des Wendebereichs aufzunehmen. Aus diesem Grund wurde an dieser Stelle beschlossen, die Zyklisierungsstudien mit einer neuen, längeren DNA-Sequenz fortzusetzen.

### 3.3.3 Zyklisierung der 32-mer Modell-DNA

#### 3.3.3.1 Modellierung einer 32-mer DNA-Sequenz

Um den Einfluss der Oligonukleotid-Zyklisierung auf die Duplexstabilität zu untersuchen, ist es von großem Vorteil, wenn die verwendete Oligonukleotid-Sequenz keine signifikante Population von weiteren Sekundärstrukturen (Haarnadelschleifen, Homo-Dimere) ausbilden kann. Weil sich die Wahrscheinlichkeit für stabilisierende Basenpaar-Wechselwirkungen mit zunehmender Länge des Oligonukleotids erhöht, ist die zufällige Aneinanderreihung der kanonischen Nukleobasen kein zielführender Ansatz für die Entwicklung einer sekundärstrukturfreien Modellsequenz. Noch komplizierter wird es für Anwendungen im Bereich von DNA-Computern und DNA-Chips, bei denen ganze Sets von Oligonukleotiden die obigen Bedingungen zueinander erfüllen müssen. In der Praxis werden längere DNA-Sequenzen daher aus kleineren Einheiten (DNA-„Wörter“) zusammengesetzt und mit Hilfe von Algorithmen geprüft, ob ein solches Wort-Set frei von Sekundärstrukturen ist.<sup>[126]</sup> Die für die Zyklisierungsstudien verwendete DNA-Sequenz **ODN2** geht auf eine Arbeit von Brenner *et al.* zur *in vitro* Klonierung von DNA-Gemischen auf Microbeads zurück.<sup>[127]</sup>

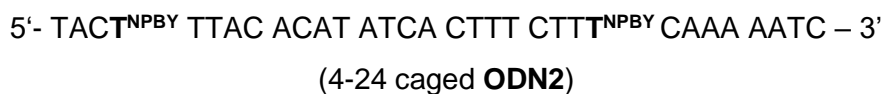
5'- TACT TTAC ACAT ATCA CTTT CTTT CAAA AATC – 3' (**ODN2**)

Die Sequenz ist aus acht DNA-„Wörtern“ mit je 4 Nukleobasen zusammengesetzt (TTAC, AATC, TACT, ATCA, ACAT, TCTA, CTTT und CAAA). Jede Worteinheit kann dabei drei A-T-Basenpaarungen und eine G-C-Basenpaarung eingehen. Um die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Sekundärstrukturen weiter zu minimieren, enthält die Sequenz darüber hinaus kein Guanosin.

Eine Sekundärstrukturvorhersage mit Hilfe der Software *mfold*, sowie mit *IDT UNAFold* ergab für **ODN2** als stabilste Struktur eine Stamm-Schleifen-Struktur zwischen T18, T19, T20 und A26, A27 und A28, wobei der berechnete Schmelzpunkt für diese Struktur bei 147 mM [Na<sup>+</sup>] (1x PBS-Puffer) ca. 12 °C beträgt und gegenüber dem berechneten Schmelzpunkt des Volllängen-Duplex (1 µM Strang, 1 µM Gegenstrang in 1x PBS) von ca. 63 °C zu vernachlässigen ist. Homo-Dimer-Strukturen liegen laut Vorhersage mit maximal vier Basenpaarungen vor, wobei die Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G$  weniger als ein Zehntel der freien Enthalpie des Hetero-Dimers (Volllängen-Duplex) beträgt und somit ebenfalls vernachlässigt werden kann.

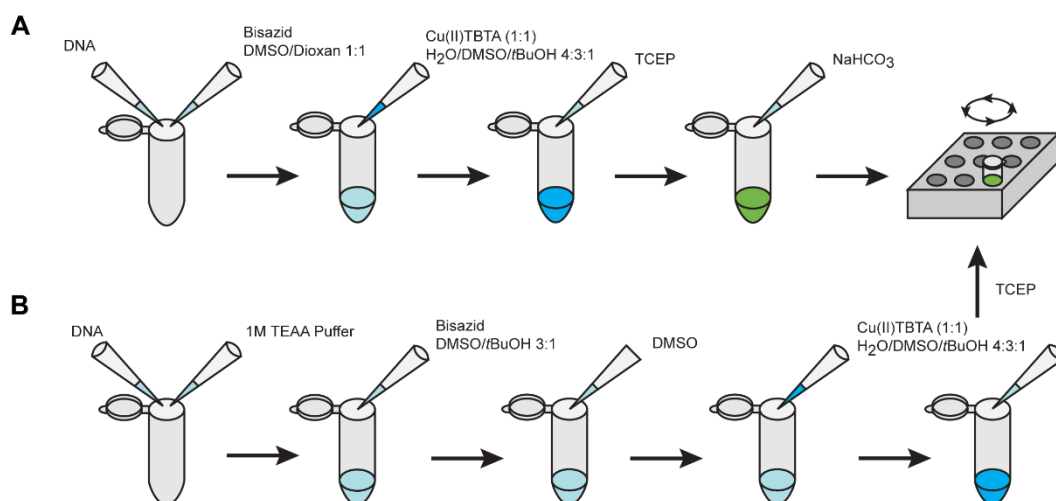
### 3.3.3.2 Optimierung der CuAAC-Zyklisierung und Charakterisierung der zyklisierten 32-mer Modell DNA

**ODN2** wurde mittels Festphasensynthese und unter Verwendung von Phosphoramidit **68** dargestellt. Photolabile NPBY-Modifikationen wurden zunächst an den Thymidinen in Position 4 und 24 eingefügt (4-24 caged **ODN2**). Durch Verwendung der UltraMILD<sup>®</sup>-Schutzgruppenstrategie konnte der Anteil des intakten, zweifach NPBY-geschützten Vollängenprodukts von 28% auf 88% gesteigert werden.



4-24 caged **ODN2** sollte daraufhin analog zur Benchmark-Sequenz mit der CuAAC-Reaktion mit Bisazid-Linker **93** zyklisiert werden. Eine Durchführung nach Seela *et al.* führte jedoch zu keiner isolierbaren Produktmenge (Abbildung 47a). Stattdessen konnte beobachtet werden, dass beim Mischen der Cu(II)TBTA-Lösung (Wasser/DMSO/tBuOH 4:3:1) mit der wässrigen DNA-Lösung nach anfänglicher Trübung rasch ein blauer, unlöslicher Feststoff ausfällt. Offensichtlich gab es ein Löslichkeitsproblem der DNA während der Zugabe der einzelnen Komponenten, sodass es sinnvoll erschien, die Reihenfolge der Zugabe so zu variieren, dass zu jedem Zeitpunkt alle Komponenten in Lösung verblieben. Dabei führte folgende Reihenfolge zu den besten Ergebnissen: Zunächst wird das Oligonukleotid vorgelegt und der Bisazid-Linker hinzugegeben. Es folgt die Zugabe der Cu(II)TBTA-Lösung, der TCEP-Lösung und schließlich die Natriumhydrogencarbonat-Lösung. Allerdings blieb auch in diesem Fall die Lösung trüb und es konnte vorerst auf der RP-HPLC weder Startmaterial noch mögliches Produkt detektiert werden. Der entscheidende Durchbruch gelang, als die trübe Reaktionslösung sich bei einer geplanten DNA-Ethanol-fällung durch Zugabe von 0,3 M Natriumacetat-Lösung plötzlich klärte. Daraufhin wurde die Reaktionslösung für weitere 24 Stunden geschüttelt und anschließend per RP-HPLC analysiert. Tatsächlich konnten erstmals signifikante Mengen sowohl des Startmaterials **ODN2**, aber auch eines Reaktionsproduktes mit früherer Retentionszeit beobachtet werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass eine Inkubation aufbewahrter Eppendorf-Reaktionsgefäße vorheriger CuAAC-Zyklisierungen ebenfalls durch Zugabe von wässriger Natriumacetat-Lösung eine Reisolierung von DNA, sowie den Start der zuvor nicht erfolgten Click-Reaktion ermöglichte. Während in den Originalarbeiten von Seela *et al.* die Funktion der Natriumhydrogencarbonat-Lösung lediglich einem besseren Reaktionsverlauf zugeschrieben wurde, schien in den Zyklisierungsexperimenten der pH-Wert der Reaktionslösung der kritische Parameter zu sein.

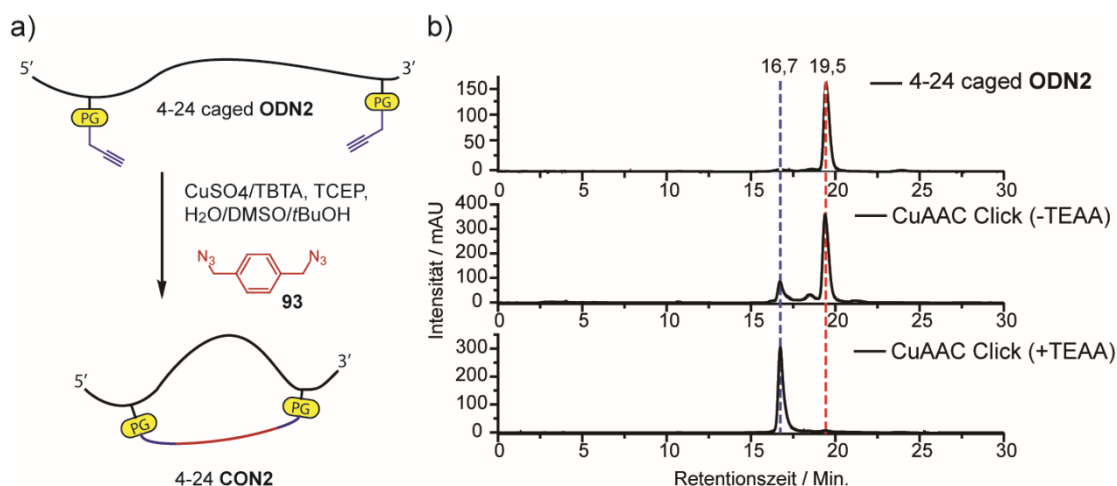
Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die Natriumhydrogencarbonat-Lösung durch wässrigen TEAA-Puffer ersetzt. Dieser hat den Vorteil, dass er durch Vakuumzentrifugation entfernt wird und nicht als potentiell schwerlösliches DNA-Salz-Gemisch im Zuge der Reaktionsaufarbeitung zurückbleibt. Ein weiterer Optimierungsschritt ist die Zugabe eines Volumenanteils DMSO, bevor DNA und Cu(II)TBTA zusammengeführt werden. Auf diese Weise wird eine Trübung der Reaktionslösung über die volle Reaktionszeit verhindert.



**Abb. 47** Durchführung der CuAAC-Zyklisierungsreaktion der Alkin-modifizierten und photolabil geschützten DNA-Oligonukleotide gemäß (A) dem ursprünglichen Protokoll nach Seela *et al.* und (B) der in dieser Arbeit optimierten Prozedur.

Unter Anwendung des optimierten Protokolls (Abbildung 47B) ist es schließlich gelungen, das zyklisierte **ODN2** herzustellen. Ein RP-HPLC-Monitoring der Reaktion zeigte dabei, dass das Startmaterial **ODN2** (19,5 Min.) zu einer einzigen, neuen Produktfraktion (16,7 Min.) reagiert, die eine ca. 3 Minuten frühere Retentionszeit aufweist (Abbildung 48 a). Die Verschiebung der Retentionszeit ist dabei konsistent zu den Ergebnissen aus der Benchmark-Oligonukleotid-Zyklisierung (Kapitel 3.3.2) und weist auf das Vorliegen einer zyklisierten Spezies 4-24 **CON2** hin. Die DNA-Konzentration wurde gegenüber den früheren Experimenten außerdem auf ca. 20  $\mu$ M reduziert, sodass eine DNA-Fraktion mit zweifacher Addition des Bisazid-Linkers hier nicht mehr beobachtet wird. Wird kein TEAA-Puffer verwendet, sondern eine wässrige Natriumhydrogencarbonat-Lösung gemäß Seela-Protokoll, so findet eine Umsetzung zum Reaktionsprodukt erst in dem Moment statt, in welchem der Rückstand in TEAA-Puffer gelöst wird (zur Injektion in die HPLC-Anlage). Interessanterweise wird hierbei eine Fraktion mit polymeren Strukturen (Nachweis durch Massenspektrometrie) beobachtet, die eine Retentionszeit zwischen Startmaterial und Produkt aufweist (Abbildung 48 b). Solche

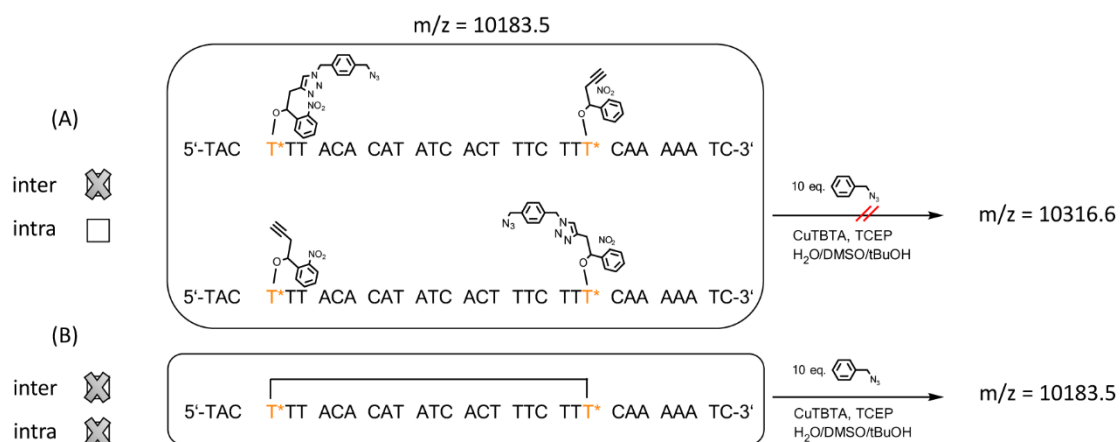
Strukturen wären begünstigt, wenn **ODN2** (temporär) in einer deutlich höheren Konzentration vorliegt als der Bisazid-Linker (z.B. beim Anlösen des ausgefallenen Reaktionsfeststoffgemischs). Zusammenfassend konnte die Reaktionsausbeute nach Aufarbeitung des zyklischen 4-24 **CON2** im Vergleich zum zyklischer Benchmark DNA **CON1** von 1-2% auf 48% gesteigert werden. Da die RP-HPLC kein Startmaterial und nicht die Entstehung von Nebenprodukten zeigte, wird vermutet, dass die Restmenge Oligonukleotid als ungelöster Rückstand (nach Vakuumzentrifugation) im Zuge der Aufarbeitung verloren geht.



**Abb. 48** (a) Reaktionsschema der Zyklisierung von 4-24 caged **ODN2** zum zyklisierten 4-24 **CON2**. (b) Monitoring der Reaktion mit RP-HPLC mit und ohne die verbesserten Reaktionsbedingungen (+TEAA-Puffer).

Als nächstes musste ein Nachweis für das Vorliegen einer zyklisierten DNA erfolgen. Für die CuAAC-Zyklisierung von 4-24 **ODN2** muss zunächst der Bisazid-Linker **93** an eine der beiden Alkin-Funktionalitäten intermolekular addieren, um dann im zweiten Schritt intramolekular zu zyklisieren. Während sich im ersten Schritt die Masse des Oligonukleotids um die Masse des Bisazid-Linkers (+188 Da) erhöht, geht der zweite Schritt ohne eine Änderung der Masse einher. Das bedeutet, dass sich die einfache Addition des Bisazid-Linkers und die zyklisierte Spezies über Massenspektrometrie alleine nicht unterscheiden lassen. Nach der Click-Zyklisierung können insgesamt drei verschiedene Spezies gebildet worden sein (Abbildung 49). Eine davon ist die zyklisierte DNA-Spezies, die anderen beiden sind die beiden möglichen Reaktionsprodukte einer Einfach-Addition des Bisazid-Linkers. Die letzteren beiden Spezies würden demnach noch über eine weitere, reaktive Alkin-Funktionalität verfügen, wohingegen das zyklisierte DNA-Produkt keine weitere Click-Reaktion eingehen könnte.

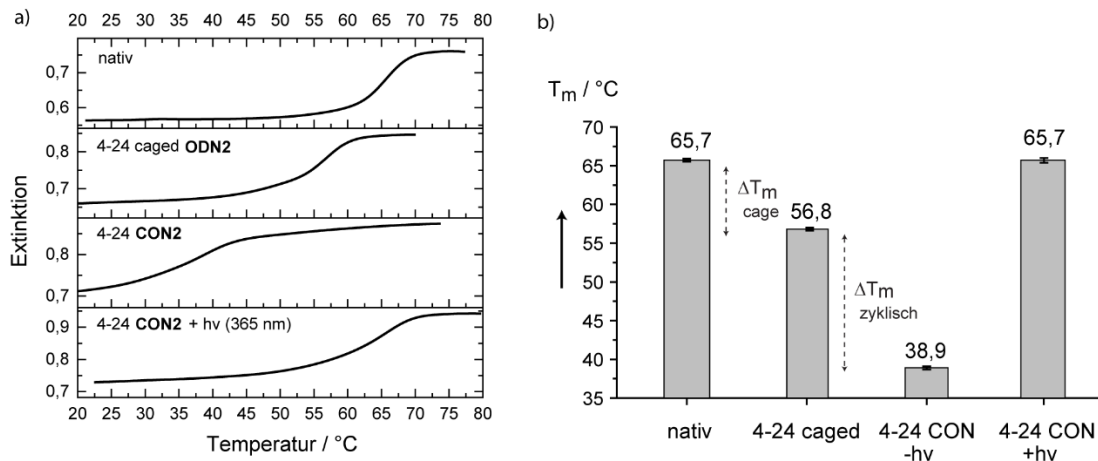




**Abb. 49** Nachweis der DNA-Zyklisierung über eine nachgeschaltete Kontroll-Click-Reaktion mit Benzylazid. In Szenario (A) würde die Reaktion mit Benzylazid zu einem neuen Produkt mit einer Masse von 10316 Da führen. In Szenario (B) würde die Kontroll-Click-Reaktion zu keiner weiteren Reaktion führen, da kein freies Alkin zur Verfügung steht. Eine Produktbildung entsprechend Szenario (A) wurde nicht beobachtet, sodass das Vorliegen einer zyklischen DNA geschlussfolgert werden konnte.

Der Nachweis der Zyklisierung wurde deshalb über eine der Zyklisierungsreaktion nachgeschalteten Kontroll-Click-Reaktion erbracht. Hierzu wurde die isolierte Fraktion 4-24 **CON2** in einer weiteren CuAAC mit Benzylazid (**94**) zur Reaktion gebracht. Die Reaktivität des Monoazids **94** gegenüber Alkin-modifizierten photolabil geschützten Oligonukleotiden wurde zuvor bereits in einem weiteren Projekt der Doktorarbeit (vgl. Kapitel 3.5.3) demonstriert. Das Ergebnis dieser Reaktion war, dass kein neuer Produktpeak in der RP-HPLC beobachtet und die Masse des Startmaterials erhalten wurde. Aus diesem Grund wurde geschlussfolgert, dass tatsächlich eine zyklisierte Spezies 4-24 **CON2** gebildet wurde. Parallel zu dieser Doktorarbeit wurde von der Seela-Gruppe Ende 2015 eine konkurrierende Arbeit veröffentlicht, die sich ausschließlich mit der End-zu-End-Zyklisierung von DNA mittels CuAAC-Reaktion unter Verwendung des Bisazid-Linkers **93** beschäftigt.<sup>[116]</sup> Der Nachweis der Zyklisierung erfolgte hier u.a. über einen enzymatischen Abbau der DNA mit alkalischer Phosphatase und Snake Venom Phosphodiesterase, bei der das kovalent verknüpfte 5'-Nukleosid-Bisazid-Linker-3'-Nukleosid Fragment der End-zu-End-Zyklisierung nachgewiesen werden konnte. Diese Studie belegt gleichermaßen, dass die CuAAC-Reaktion unter den optimierten Bedingungen (Verdünnung, Äquivalente) selektiv die intramolekulare Zyklisierung zweifach alkylierter DNA bewirkt.

Mit dem Nachweis der Zyklisierung konnte nun der Einfluss derselbigen auf die Duplexstabilität der DNA untersucht werden. Hierzu wurde mit Hilfe von temperaturabhängiger UV/Vis-Spektroskopie der Schmelzpunkt des nativen DNA-Duplexes, des zweifach an Position 4 und 24 NPBY-modifizierten DNA-Duplexes 4-24 caged **ODN2**, sowie des zyklisierten 4-24 **CON2** bestimmt.

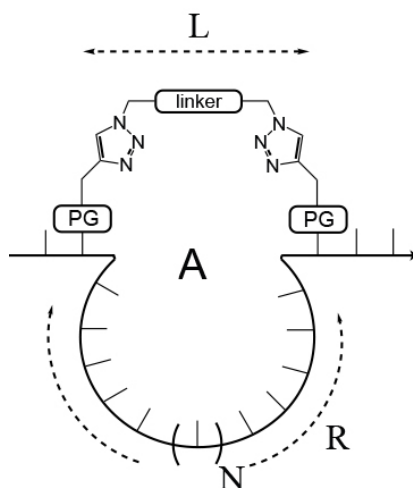


**Abb. 50** (a) Schmelzpunktkurven (temperaturabhängige UV/Vis-Spektroskopie) der nativen 32-mer DNA, des zweifach 4-24 NPBY-geschützten **ODN2**, sowie des zyklisierten 4-24 **CON2** vor und nach Belichtung bei 365 nm jeweils 1  $\mu$ M in 1x PBS-Puffer. Es wurden pro Oligonukleotid sieben Messungen durchgeführt (vier Aufheiz-, drei Abkühlkurven). Dargestellt sind die daraus erhaltenen Mittelwertskurven. (b) Auftragung der gemessenen Schmelzpunkte (bestimmt mittels Wendepunkt-Methode)

Zur Bestimmung der DNA-Schmelzpunkte wurde das Wendepunkt-Verfahren angewendet, also das Maximum der ersten Ableitung der Schmelzpunktkurven ermittelt. Der native DNA-Duplex **ODN2** besitzt einen Schmelzpunkt von 65,7 °C. Werden die zwei photolabilen NPBY-Modifikationen an Thymidin in Position 4 und 24 angebracht (4-24 caged), so erniedrigt sich der Schmelzpunkt um ca. 9 °C auf einen Wert von 56,8 °C. Wird der photolabil geschützte Strang nun zum Derivat 4-24 **CON2** zyklisiert, dann wird eine zusätzliche Duplexdestabilisierung erzeugt, die sich in einem Schmelzpunkt von nur noch 38,9 °C (nah an physiologischen Bedingungen) widerspiegelt. Das entspricht einem  $\Delta T_m$  von fast 18 °C und damit ca. einer doppelten Erniedrigung gegenüber dem Schmelzpunkt, welcher durch den Einbau der NPBY-Modifikationen alleine erreicht wurde. Gegenüber dem nativen DNA-Duplex entspricht dies einem Gesamt- $\Delta T_m$ -Wert von etwa 27 °C. Nachdem nun für die Zyklisierungsstrategie ein dramatischer Effekt auf die Duplexstabilität gezeigt werden konnte, ist es für die Nutzung zur Photoaktivierung von funktionellen Oligonukleotiden wichtig, dass die Belichtung zur Wiederherstellung der ursprünglichen, nativen DNA führt. Aus diesem Grund wurde 4-24 **CON2** in einem weiteren Experiment bei 365 nm bis zur vollständigen Photolyse belichtet und daraufhin erneut eine Schmelzpunktmessung durchgeführt. Die resultierende Schmelzpunktkurve ergibt einen Schmelzpunkt, der mit dem Schmelzpunkt der nativen DNA identisch ist. Durch diesen „Proof of Principle“ konnte somit auf Ebene der Schmelzpunktmessungen erstmals bewiesen werden, dass das in dieser Arbeit entwickelte Zyklisierungskonzept entlang der Watson-Crick-Basenseite eine Licht-Schaltbarkeit der DNA-Hybridisierung bewirkt, die dem analogen Einbringen zweier Schutzgruppen nach klassischem Vorgehen deutlich überlegen ist.

### 3.3.3.3 Variation der Zyklisierungsparameter

Die Zyklisierung von **ODN2** an Position 4 und 24 war nur ein willkürlicher erster Versuch, um ein zuverlässiges Protokoll für die CuAAC-Reaktion zu entwickeln und einen ersten Eindruck von den Auswirkungen der Zyklisierung auf die Duplexstabilität zu gewinnen.

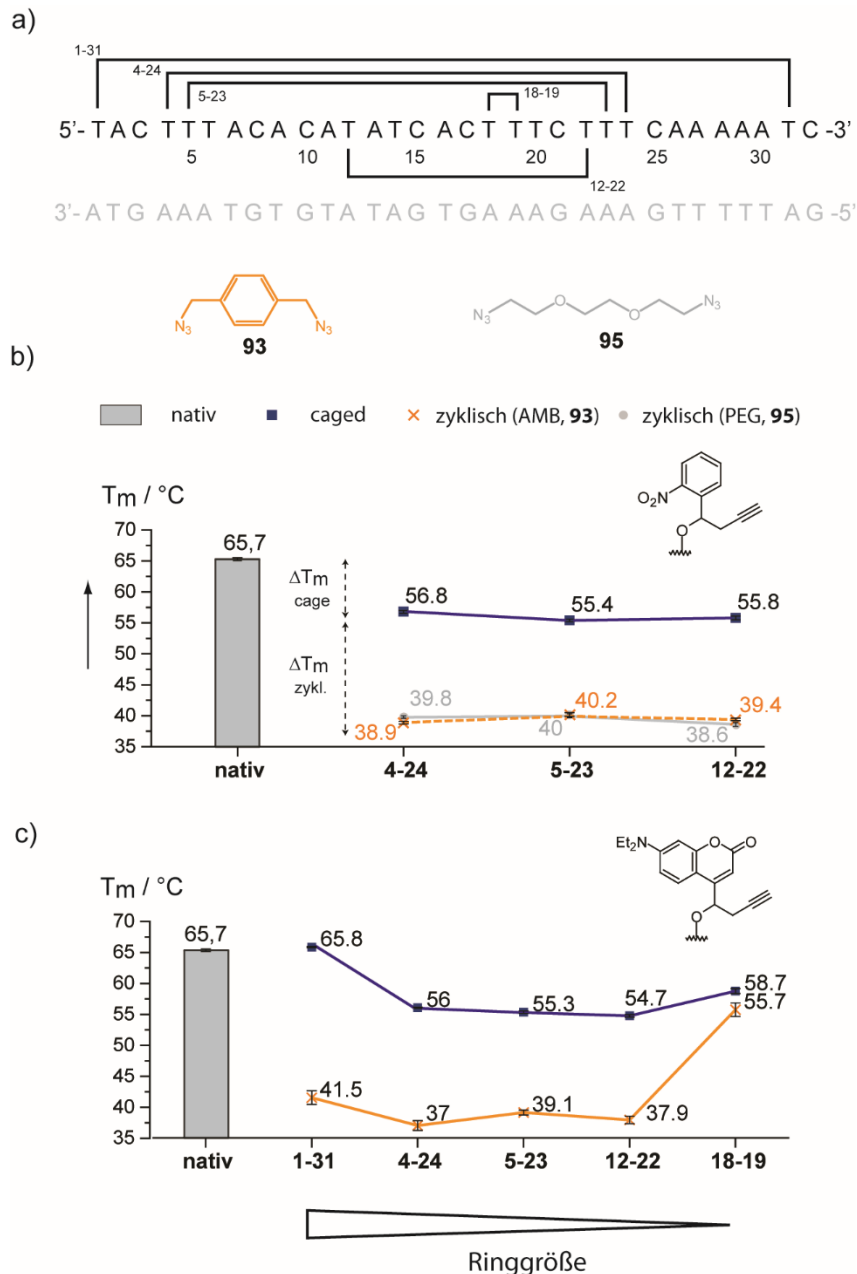


**Abb. 51** Die Duplexstabilität der zyklierten DNA hängt potentiell von verschiedenen Zyklisierungsparametern wie der Ringgröße  $R$  bzw. die Anzahl der im Ring befindlichen Nucleoside  $N$ , sowie der Länge  $L$ , Flexibilität und Polarität des Linkers, sowie der Wahl der photolabilen Schutzgruppe (PG) ab.

Es wurde angenommen, dass sich Parameter wie die Ringgröße und -position, die Linkerlänge, -flexibilität und -polarität, sowie die Schutzgruppen selbst unterschiedlich auf die Stabilität des DNA-Duplexes auswirken. Beispielsweise sollte ein kurzer starrer Linker eine höhere Ringspannung als ein langer flexibler Linker ergeben. Aus diesem Grund sollten in den folgenden Experimenten diese Parameter variiert und dadurch eine optimale Zyklisierungsstrategie mit maximaler Duplexdestabilisierung erarbeitet werden.

Der Einbau der Alkin-modifizierten photolabilen NPBY- oder DEACBY-Schutzgruppe inmitten der Oligonukleotidsequenz (Positionen 4-24, 55-23, 12-22) führt zu einer nur mäßigen Erniedrigung der Schmelzpunkte auf ein Niveau von 55-57 °C. Werden die zweifach-modifizierten Oligonukleotide zykliert, so erniedrigt sich der Schmelzpunkt auf Werte zwischen 37 °C und 40 °C. Im Falle der NPBY-Schutzgruppe wurde für die Zyklisierung sowohl der eher kurze, starre und unpolare AMB-Linker **93**, als auch der längere, flexible und polarere PEG-Linker **95** verwendet (Abbildung 52b). Allerdings scheint die Wahl des Linkers im untersuchten Ringgrößenbereich keinen Einfluss auf die Duplexstabilität zu haben. Auch die Ringgröße selbst, die in diesen Experimenten zwischen 11 und 21 Nucleotiden umfasst, scheint in diesem Längenbereich keinen signifikanten Unterschied auf die Lage des

gemessenen Schmelzpunktes zu haben. Dasselbe Ergebnis konnte bei Austausch der NPBY-Schutzgruppe durch die DEACBY-Schutzgruppe beobachtet werden. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die hier entwickelte Zyklisierungsstrategie durch ihre globale Störung der Duplexstruktur ein vergleichsweise robuster Ansatz ist und die Optimierung der Zyklisierungsparameter für ein beliebiges Oligonukleotid von Interesse womöglich garnicht notwendig ist.



**Abb. 52** (a) Übersicht der verschiedenen Modifikations- und Zyklisierungspositionen zur Variation der Ringgröße und -position (b) Schmelzpunkte der nativen **ODN2**, sowie den zweifach NPBY-modifizierten Varianten mit unterschiedlichen Modifikationspositionen und den entsprechenden zyklischen **CON2** unter Verwendung des rigiden, unpolaren AMB-Linkers **93** oder des flexiblen, polareren Polyethylenglykol-(PEG-)Linkers **95**. (c) Schmelzpunktstudien analog (b) mit DEACBY-Derivaten vor und nach Zyklisierung mit AMB-Linker **93** mit unterschiedlichen Modifikationsstellen und daraus resultierenden Ringgrößen und -positionen.

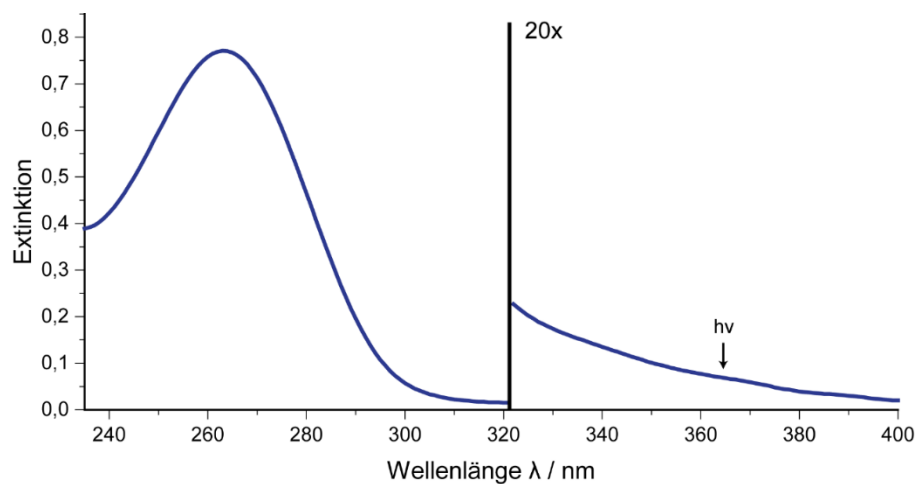
Nichtsdestotrotz sollte, wie in den zuvor publizierten Arbeiten über End-zu-End-zyklisierte Antisense-Oligonukleotide beobachtet (vgl. Kapitel 1.2.3), die Duplexstabilität nicht unabhängig von der Ringgröße sein. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Satz von Experimenten mit der DEACBY-Schutzgruppe ein besonders großer (Position 1-31) und ein besonders kleiner (Position 18-19) Ring untersucht (Abbildung 52c). Der Einbau der photolabilen Modifikationen mit sehr großem Abstand ergab im Rahmen des Messfehlers dieselbe Schmelztemperatur wie die native **ODN2**. Dies ist nicht verwunderlich, da die Enden der DNA ohnehin in stärkerer Interaktion mit dem Lösungsmittel stehen und dadurch die Basenpaare von vornherein schwächer gebunden sind und wenig zur Gesamtstabilität des Duplexes beitragen. Im Falle der direkt benachbarten photolabilen DEACBY-Modifikationen (18-19 caged **ODN2**) wird ein vergleichsweise hoher Schmelzpunkt von 58,7 °C gemessen. Dies ist ebenfalls nicht verwunderlich, da der Einbau benachbarter Schutzgruppen die Störung des DNA-Duplexes lediglich lokal erhöht und der destabilisierende Effekt entlang der gesamten Sequenz daher kleiner ausfällt, als bei einer Verteilung der Schutzgruppen. Die Zyklisierung an Position 18-19 führt zu einem besonders kleinen Ring inmitten des 32-mer Oligonukleotids. Damit geht eine weitere Schmelzpunktniedrigung von nur etwa 3 °C gegenüber dem Einbau der photolabilen Schutzgruppen alleine ein. Dies entspricht der Erwartung für besonders kleine Ringstrukturen, da diese zwar gespannt vorliegen, diese Spannung jedoch nicht über die gesamte Oligonukleotid-Sequenz wirkt. Anders sieht es bei der Zyklisierung des besonders langen Abstands (1-31) aus. Der entsprechende Zyklus umschließt 31 Nukleotide und weist eine niedrige Schmelztemperatur von 41,5 °C auf. Da der Einbau der photolabilen DEACBY-Schutzgruppen bei diesem Konstrukt vor der Zyklisierung gar keinen destabilisierenden Einfluss hatte, kann die gesamte Duplexdestabilisierung mit einem  $\Delta T_m$  von 24,3 °C allein auf die Zyklisierung zurückgeführt werden. Das wichtigste Ergebnis dieser Experimente ist jedoch, dass der absolut niedrigste Schmelzpunkt nicht etwa für die End-zu-End-Zyklisierung, die hier in etwa dem zyklischen 1-31-Konstrukt entspricht, gemessen wurde, sondern für jene zyklische Oligonukleotide, bei denen der Ring inmitten der Sequenz mit Ringgrößen zwischen 11 und 21 Nukleotiden aufgebaut wurde. Damit konnte bereits für das noch relativ kurze 32-mer Oligonukleotid der Vorteil der intrasequenziellen Zyklisierung gegenüber der bisher in der Literatur verwendeten End-zu-End-Zyklisierung gezeigt werden.

#### **3.3.3.4 Photochemische Charakterisierung der zyklischen 32-mer DNA**

Die Quantenausbeute einer photolabilen Schutzgruppe ist keine Konstante, sondern hängt von der Güte der Abgangsgruppe ab. Im Falle der photolabil geschützten 32-mer DNA ist die Abgangsgruppe ein Makromolekül, welches über verschiedene Wechselwirkungsmöglichkeiten (Interkalation, Wasserstoffbrücken-Bindungen, hydrophobe Wechselwirkungen, Abschirmung vom Lösungsmittel, usw.) nicht nur die Quantenausbeute,

sondern auch den Extinktionskoeffizienten, sowie die Lage des Absorptionsmaximums der photolabilen Schutzgruppe beeinflussen kann. Aus diesem Grund ist es für spätere Anwendungen sinnvoll, photolabil geschützte Oligonukleotide vorab spektroskopisch zu charakterisieren.

In Abbildung 53 ist das UV/Vis-Spektrum des zyklisierten 5-23 NPBY-AMB **CON2** gezeigt. *Ortho*-Nitrobenzylschutzgruppen auf Oligonukleotiden werden zur Vermeidung von DNA-Schäden typischerweise ab einer Wellenlänge von 365 nm abgespalten. Die Absorption der DNA bei 365 nm ist jedoch verschwindend gering gegenüber der Absorption beim Maximum von 264 nm. Aus diesem Grund wurde die Absorption sowohl bei 2  $\mu\text{M}$ -, als auch bei 40  $\mu\text{M}$ -Konzentration der DNA in 1x PBS-Puffer vermessen. Bei einer Wellenlänge von 365 nm beträgt der molare dekadische Extinktionskoeffizient hierbei  $\varepsilon(365) = 1700 \frac{\text{l}}{\text{mol cm}}$ .



**Abb. 53** UV/Vis-Spektrum des zyklisierten 5-23 NPBY-AMB **CON2** in 2  $\mu\text{M}$  und zur Erhöhung der Sensitivität bei größeren Wellenlängen in 40  $\mu\text{M}$ -Konzentration (1x PBS-Puffer)

Die Absorption einer photolabil geschützten Verbindung bei einer bestimmten Wellenlänge garantiert nicht, dass bei dieser Wellenlänge auch eine Photolysereaktion stattfindet, denn auch die Quantenausbeute ist wellenlängenabhängig.

Die Quantenausbeute  $\Phi$  einer Photolyse-Reaktion ist definiert als der Quotient der Anzahl eintretender Photolysereaktionen  $n_u$  pro Anzahl absorbierter Photonen  $n_a$  (Formel 1).

$$\Phi = \frac{n_u}{n_a} \quad (1)$$

Um die Quantenausbeute einer Photolysereaktion bei einer bestimmten Wellenlänge zu ermitteln, wird Formel (1) differentiell ausgedrückt.

$$\Phi = \frac{dn_u}{dn_a} \quad (2)$$

Für die Belichtung wird eine Strahlenquelle mit einem Photonenfluss  $q$  [ $\text{mol s}^{-1}$ ] verwendet:

$$q = \frac{dn_p}{dt} \quad (3)$$

mit  $dn_p$  der Anzahl emittierter Photonen pro Zeitintervall  $dt$ .

Beim Belichten der Probe wird ein prozentualer bzw. relativer Teil  $A_{rel}$  der emittierten Photonen  $dn_p$  absorbiert,

$$A_{rel} = 1 - T = 1 - 10^{-A} \quad (4)$$

wobei  $T$  die Transmission und  $A$  die Extinktion bezeichnet, sodass die Anzahl der absorbierten Photonen folgendermaßen ausgedrückt werden kann:

$$dn_a = q(1 - 10^{-A})dt \quad (5)$$

Die Quantenausbeute der Photolyse ergibt sich durch Kombination von Formel (2) und (5) zu

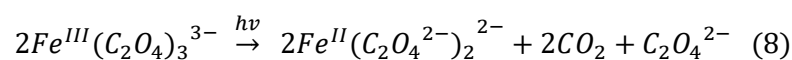
$$\Phi = \frac{dn_u}{q(1 - 10^{-A})dt} \quad (6)$$

In der praktischen Durchführung der Quantenausbeutebestimmung muss also die Änderung der Stoffmenge  $dn_u$  des photolabil geschützten Oligonukleotids bei einem kurzen Belichtungsintervall  $dt$  gemessen werden. Außerdem muss der Photonenfluss  $q$  in der Belichtungsküvette bekannt sein. Der Photonenfluss  $q$  kann prinzipiell absolut über folgende Beziehung zur Strahlungsleistung  $P_\lambda$  gemessen werden:

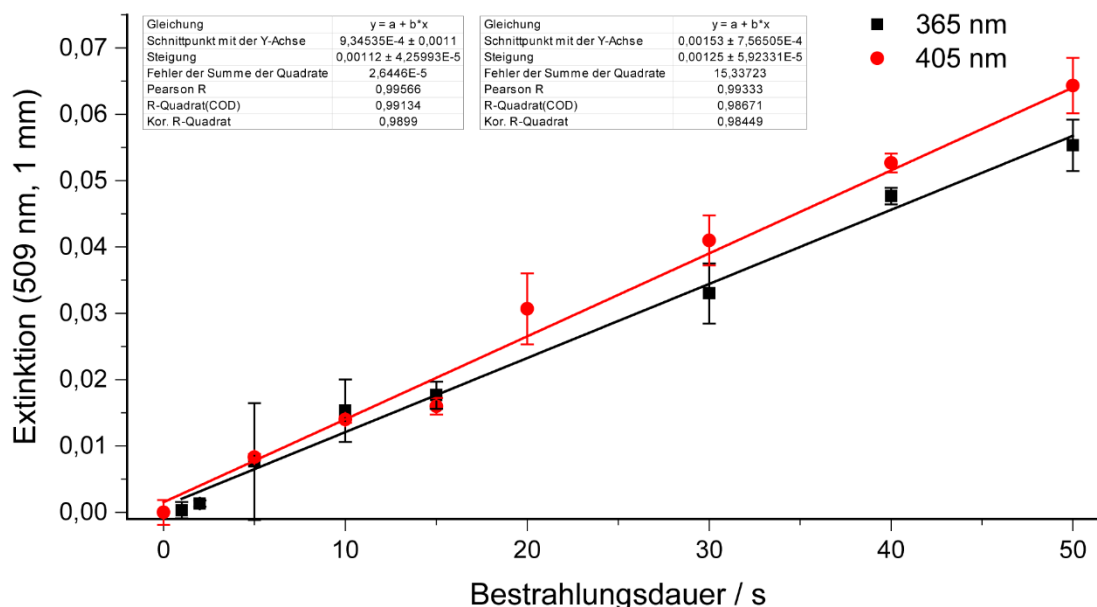
$$P_\lambda = qN_Ahc\bar{\nu} \quad (7)$$

mit der Avogadro-Konstante  $N_A$ , dem Planckschen Wirkungsquantum  $h$ , der Lichtgeschwindigkeit  $c$  und der Wellenzahl  $\bar{\nu}$ .

Allerdings ist es in der Praxis deutlich einfacher, den Photonenfluss durch Vergleich mit einem Referenzsystem bekannter Quantenausbeute zu bestimmen. Dieses Vorgehen bezeichnet man als Aktinometrie, das Referenzsystem als Aktinometer. Für die Quantenausbeutebestimmung photoaktivierbarer Oligonukleotide wurde im Gegensatz zu früheren Doktorarbeiten im Arbeitskreis Heckel in dieser Arbeit ein Ferrioxalat-Aktinometer verwendet. Der Hauptgrund liegt dabei in der Anwendbarkeit des Ferrioxalat-Aktinometers im Wellenlängenbereich vom UV-Bereich bis über 500 nm. Die hierbei zugrunde liegende Photoreaktion verläuft nach Nettogleichung (8):<sup>[128]</sup>



Durch Belichtung einer wässrigen Kaliumferrioxalatlösung wird Eisen(+III) zu Eisen(+II) reduziert, während zugleich Oxalat-Liganden zu  $\text{CO}_2$  oxidiert werden. Das frisch gebildete Eisen(+II) wird dann mit einer Phenanthrolin-Lösung versetzt, wobei sich ein farbiger Komplex bildet. Die Bildung dieses Komplexes ( $= dn_{\nu}$ ) kann dann durch Messung der Absorption bei 509 nm quantifiziert werden (Abbildung 54). Die Quantenausbeute der Reaktion ist für verschiedene Wellenlängen literaturbekannt und hat bei 365 nm beispielsweise einen Wert von  $\phi = 1.22$ .<sup>[129]</sup> Die Belichtung des Ferrioxalats wird bei einer ausreichend hohen Konzentration durchgeführt (6 mM), sodass die relative Absorption ( $1 - 10^{-4}$ )  $\approx 1$  ist. Deshalb kann durch Umstellen aus Gleichung (6) direkt der Photonenfluss  $q$  der Belichtungsapparatur berechnet werden.



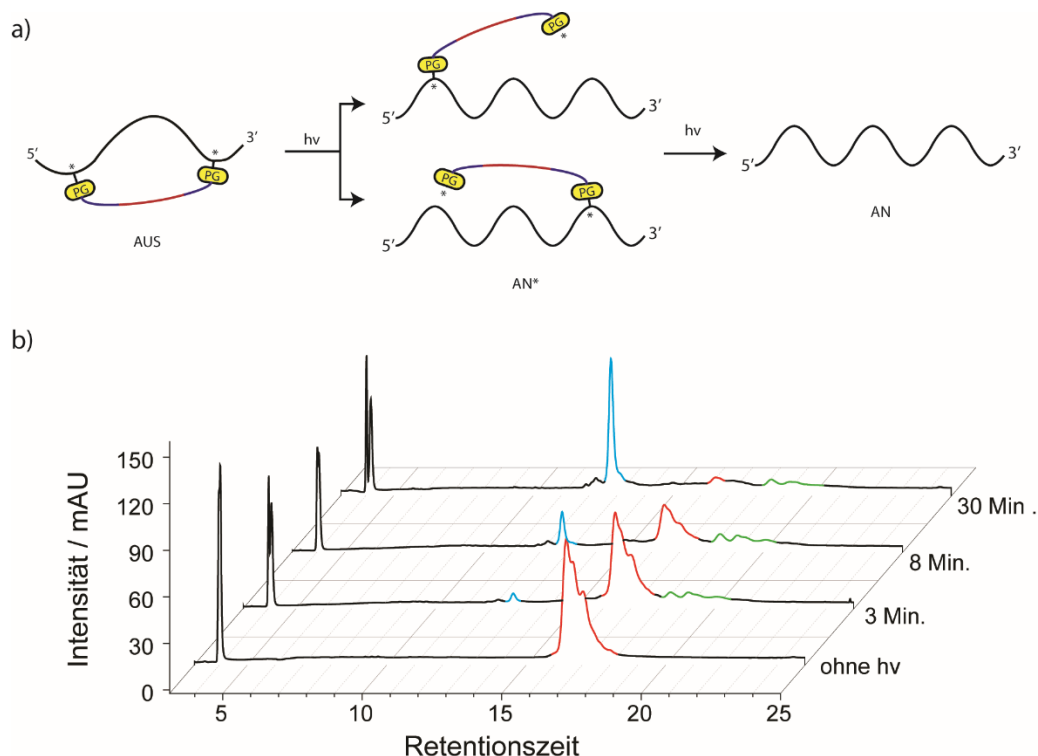
**Abb. 54** Ferrioxalometrie zur Bestimmung des Photonenfluss  $q$ . Aufgetragen ist die Absorption des Fe(II)-Phenanthrolin-Komplexes als Funktion der Bestrahlungsdauer bei 365 nm bzw. bei 405 nm. Aus der Steigung der Absorption lässt sich die Änderung der Stoffmenge von Fe(II) bestimmen.

Für die in den Belichtungsexperimenten verwendeten Thorlabs-LEDs (365 nm und 405 nm) unter Verwendung einer 13  $\mu\text{l}$  Quarz-Küvette konnten so der Photonenfluss beispielsweise zu  $q(365 \text{ nm}) = 137 \pm 4$  bzw.  $q(405 \text{ nm}) = 161 \pm 8 \frac{\text{pmol}}{\text{s}}$  bestimmt werden.<sup>[130]</sup>

Um nun die Quantenausbeuten der Photolyse des zyklisierten 5-23 NPB-Y-AMB **CON2** zu erhalten, musste entsprechend Gleichung (6) ein Belichtungsexperiment durchgeführt werden, bei dem nach unterschiedlichen Belichtungszeiten die Änderung der Konzentration des zyklischen Startmaterials bestimmt wurde. In Abbildung 55 sind die RP-HPLC-Chromatogramme vor und nach Belichtung mit repräsentativen Zeitintervallen



zusammengefasst. Für das zyklisierte 5-23 NPBY-AMB **CON2** wird ein breiter Peak zwischen 17 und 19 Minuten beobachtet (orange-farbene Kurve), welcher aus den vier möglichen Diastereomeren der beiden NPBY-Modifikationen zusammengesetzt ist. Nach 30 Minuten Belichtungszeit ist hauptsächlich das entschützte Oligonukleotid **ODN2** mit früherer Retention zu sehen (blauer Peak in Abbildung 55b). In den Belichtungsintervallen dazwischen kann die Population einer Zwischenstufe mit späterer Retentionszeit zwischen 17 und 20 Minuten beobachtet werden (grüner Peak). In einigen Chromatogrammen kann eine deutliche Abgrenzung dieses Signalsets in vier Einzelpeaks beobachtet werden.



**Abb. 55** (a) Photolysereaktion des zyklisierten 5-23 NPBY-AMB **CON2** über zwei Stufen (b) RP-HPLC-Chromatogramm (detektiert bei 260 nm) des zyklisierten 5-23 NPBY-AMB **CON2** vor und nach Belichtung für unterschiedliche Zeitintervalle bei 365 nm (45 mW, 20  $\mu$ M in 1xPBS-Puffer in einer 13  $\mu$ l Küvette) mit internem Uridin/Uracil-Standard. Das Startmaterial (orange) liegt als Diastereomengemisch aus vier Komponenten vor und geht über eine Zwischenstufe (grün) in das achirale lineare Produkt **ODN2** (blau) über.

Da die zyklisierte DNA über zwei photolabile Schutzgruppen verknüpft vorliegt, führt der erste Entschützungsvorgang zu einer linearen DNA-Spezies, die an einer der beiden vormals modifizierten Thymidinbausteine 5 bzw. 23 den Bisazid-Linker AMB trägt. Da jede dieser beiden geöffneten DNA-Spezies nach wie vor über einen chiralen NPBY-Baustein verfügt, werden insgesamt vier mögliche Zwischenprodukte erwartet. Da die geöffnete DNA-Spezies zudem einen unpolaren Linker trägt und nicht zyklisch vorliegt, ist eine spätere Retentionszeit verglichen mit dem zyklischen Startmaterial plausibel.

Aus den Integralen der Eduktpeaks im Verhältnis zum Integral des internen Standards kann die Abnahme des Edukts als Funktion der Belichtungsdauer aufgetragen werden (Abbildung 56, schwarze Kurve). Das Geschwindigkeitsgesetz für die Abnahme des zyklischen 5-23 **CON2** kann aus Gleichung (6) wie folgt abgeleitet werden (Umstellen und Teilen beider Seiten durch das Volumen  $V$ ):

$$\frac{d[CON]}{dt} = -(1 - 10^{A_{CON}}) \cdot \frac{q}{V} \cdot \Phi \quad (9)$$

Gleichung (9) kann nicht direkt integriert werden. Der kritische Term  $1 - 10^{A_{CON}}$  kann jedoch über eine Taylor-Reihenentwicklung für  $\lim_{A_{CON} \rightarrow 0}$  ausgedrückt werden,

$$1 - 10^{A_{CON}} \cong \ln(10) \cdot A_{CON} - \frac{\ln^2(10)}{2} \cdot A_{CON}^2 + \frac{\ln^3(10)}{6} \cdot A_{CON}^3 - \dots \quad (10)$$

sodass für kleine Absorption von  $A_{CON} \ll 0,1$  in guter Näherung  $1 - 10^{A_{CON}} \cong \ln(10) \cdot A_{CON}$  gilt. Eingesetzt in das Geschwindigkeitsgesetz aus Formel (9) und unter Anwendung des Lambert-Beer-Gesetzes ergibt sich damit die Differentialgleichung

$$\frac{d[CON]}{dt} = -\ln(10) \cdot A_{CON} \cdot \frac{q}{V} \cdot \Phi = \underbrace{-\ln(10) \cdot \varepsilon_{CON} \cdot d \cdot \frac{q}{V} \cdot \Phi}_k \cdot [CON] \quad (11)$$

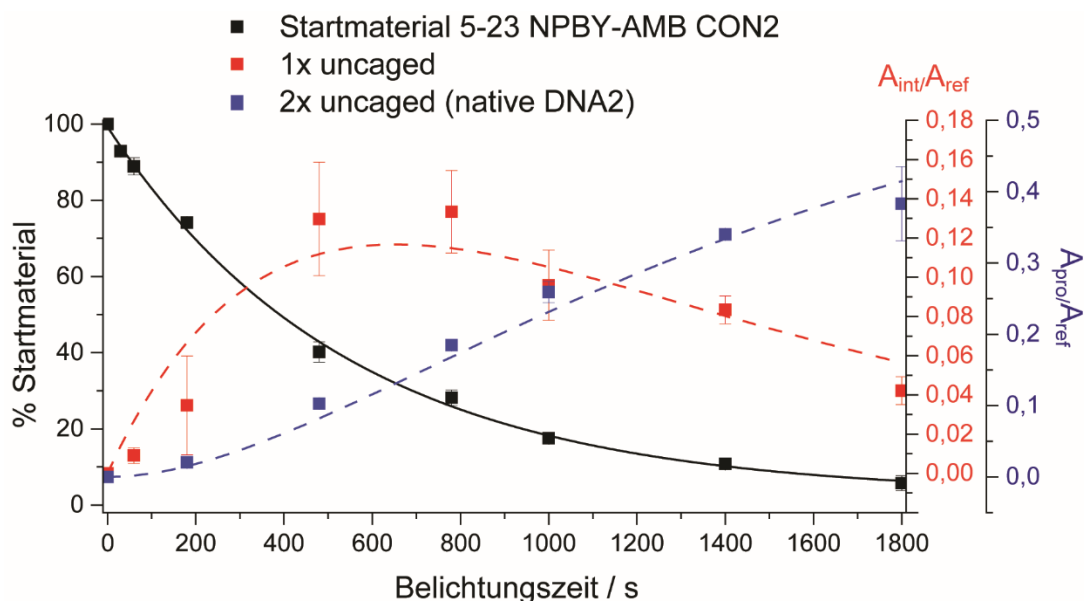
welche die monoexponentielle Funktion

$$[CON] = [CON]_0 e^{-kt} \quad (12)$$

zur Lösung hat. Für die Berechnung der Quantenausbeute wird die infinitesimale Änderung der Stoffmenge zum Zeitpunkt  $t = 0$  aus der 1. Ableitung der gefitteten Exponentialfunktion (12) bestimmt. Nur für diesen Fall ist Gleichung (9) gültig, da im Laufe der Photolyse der NPBY-Schutzgruppe auch Photolyseprodukte freigesetzt werden, die wie die intakte Schutzgruppe selbst bei 365 nm absorbieren und somit einen nicht vernachlässigbaren Anteil des eingestrahlten Photonenfluss  $q$  abfangen (interner Filter). Für das zyklisierte 5-23 NPBY-AMB **CON2** wurde für die Photolyse des Startmaterials eine Quantenausbeute von  $\Phi = 0,044 \pm 0,002$  und eine Photolyseeffizienz  $\varepsilon \cdot \Phi = 75 \pm 3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bestimmt.

Im Folgenden soll noch kurz auf die Analyse der Reaktionszwischenprodukte bzw. der Bildung der Freisetzung der nativen **ODN2** eingegangen werden, die optimalerweise quantitativ verläuft. Bei der Auswertung der RP-HPLC-Chromatogramme sind hauptsächlich zwei Probleme aufgetreten. Das erste Problem ist die Quantifizierung des Auf- und Abbaus der Reaktionszwischenprodukte. Während für die Photolyse des Startmaterials die relative Fläche von Eduktpeak zu Referenzpeak zum Zeitpunkt  $t = 0$  auf 100% gesetzt werden kann, fehlt ein

solcher Bezug sowohl für die Zwischenprodukte, als auch für das Produkt (da durch das Totvolumen der Küvette selbst bei langer Belichtungsdauer eine Restmenge Edukt verbleibt).



**Abb. 56** Photolyse des zyklisierten 5-23 NPBY-AMB **CON2** (schwarz), Bildung der einfach-entschützten linearen DNA-Spezies (rot) und Freisetzung des vollständig entschützten Produkts **ODN2** (blau). Die Photolyse des zyklisierten **CON2** wurde exponentiell gefittet, die Kurven für die Entstehung der einfach-entschützten Spezies ( $k_1 = 1,83 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 1,27 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ), sowie der vollentschützter **ODN2** wurden entsprechend der Kinetik einer Folgereaktion 1. Ordnung simuliert ( $k_1 = 1,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 1,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ).

Dies wäre kein Problem, wenn man für die Extinktionskoeffizienten der verschiedenen DNA-Spezies die in guter Näherung gültige Annahme macht, dass diese bei ca. 260 nm identisch sind. Allerdings wurde bei den RP-HPLC-Chromatogramme festgestellt, dass das relative Integral der Produktpeaks zur Referenz nach fast vollständiger Photolyse nur etwa ein Drittel des relativen Integrals von Startmaterialpeaks zu Referenz ergibt. Auch die Summe der relativen Integrale von Zwischenprodukt und Endprodukt ergibt weniger als die Hälfte des ursprünglichen Integrals des Startmaterials. Auch die Beobachtung, dass im Zuge der über viele Stunden andauernden HPLC-Injektionen die Intensität aller Signale trotz konstanter Probenmenge und -konzentration systematisch kleiner wurde, deutet auf einen möglichen systematischen Fehler (z.B. Adsorption der Probe an Injektionsglasgefäß) hin. Über die genaue Ursache kann an dieser Stelle aber nur spekuliert werden. Auch wenn die absoluten Stoffmengen der Zwischenprodukte und der freigesetzten **ODN2** nicht bekannt sind, lassen sich aus den Daten in Abbildung 56 ähnlich einer Studie von Jain *et al.* einige zusätzliche Informationen gewinnen.<sup>[131]</sup> Entsprechend Schema 55a läuft die Entschützungsreaktion des zyklisierten Oligonukleotids über zwei Stufen, die photochemisch nicht gekoppelt sind. Aus diesem Grund sollte die Photolyse (bei  $A \ll 0,1$ ) näherungsweise der Kinetik einer Folgereaktion Pseudo-1. Ordnung folgen<sup>[132,133]</sup>:

Folgereaktion 1. Ordnung:  $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C$

$$[A] = [A]_0 e^{-\frac{k_1}{t}} \quad (13)$$

$$[B] = \frac{[A]_0 k_1}{k_2 - k_1} \left( e^{-\frac{k_2}{t}} - e^{-\frac{k_1}{t}} \right) \quad (14)$$

$$[C] = [A]_0 \left( 1 - \frac{1}{k_2 - k_1} \left( k_2 e^{-\frac{k_1}{t}} - k_1 e^{-\frac{k_2}{t}} \right) \right) \quad (15)$$

wobei die Konzentrationen  $[B]_0$  und  $[C]_0$  zu Beginn der Reaktion = 0 gesetzt wurden. Zur Analyse der Kinetik wurde ferner der Zusammenhang zwischen Wendestelle und Reaktionskonstanten ausgenutzt:

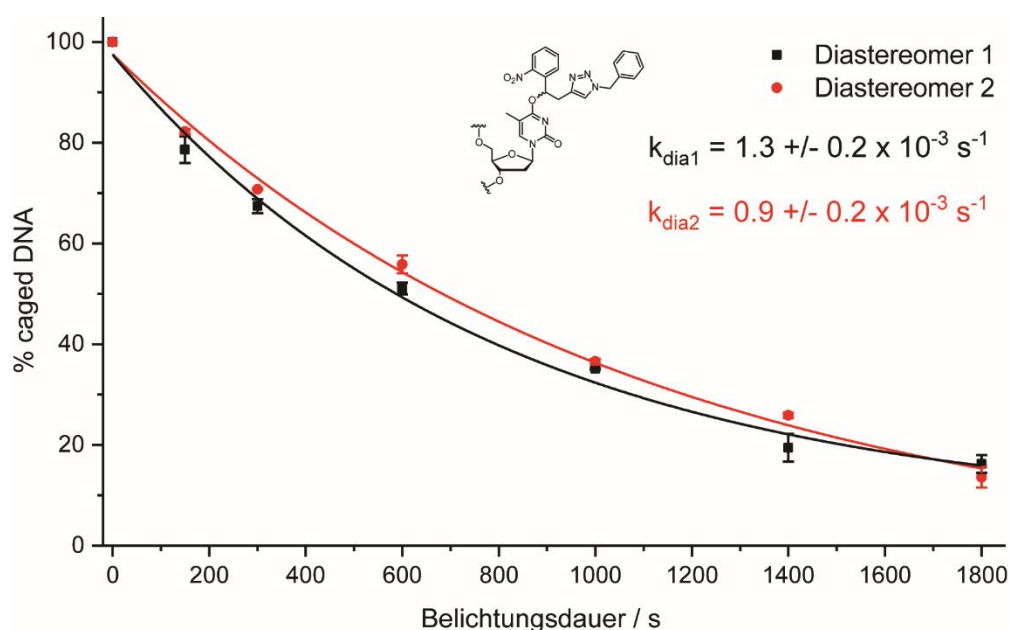
$$t_{Wende} = \frac{\ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right)}{k_1 - k_2} \quad (16)$$

Die Konstante  $k_1$  wurde durch Fit einer monoexponentiellen Funktion gemäß Gl. (13) im Zuge der Quantenausbeutenbestimmung zu  $k_1 = 1,8 \times 10^{-3} \pm 0,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bestimmt.

Zur Bestimmung der Konstante  $k_2$  wurden nun zwei verschiedene Methoden verwendet. Die Datenpunkte der Zwischenproduktbildung wurden mit Gleichung 14 und fixiertem  $k_1$  (Abbildung 56, rote Kurve) gefittet. Daraus ergab sich  $k_2 = 1,3 \times 10^{-3} \pm 0,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  mit einem relativ großen Fit-Fehler. Da sich die Datenpunkte der Freisetzung der nativen **ODN2** nicht zufriedenstellend mit der Funktion aus Gleichung (11) fitten ließen, wurde zunächst ein polynomieller Fit durchgeführt und aus dem Maximum der 1. Ableitung die Wendestelle  $t_{Wende} \approx 739 \text{ s}$  bestimmt. Unter Verwendung von Gleichung (16) und der bekannten Konstante  $k_1$  wurde so numerisch  $k_2 = 1,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bestimmt. In Abbildung 56 wurde Gleichung (15) mit fixiertem  $k_1$  und  $k_2$  an die Datenpunkte gefittet (blaue Kurve).

Die Bestimmung der Reaktionskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  erfolgte mit dem Ziel, die folgende Hypothese zu untermauern: Das zyklisierte 5-23 NPB-Y-AMB **CON2** ist temporär deaktiviert, wobei für die Zyklisierung zwei photolabile Verknüpfungsstellen verwendet werden. Für die vollständige Aktivierung muss jedoch nur eine dieser kovalenten Verknüpfungen aufgebrochen werden (eine einzelne photolabile Schutzgruppe wirkt sich nicht stark auf die Duplexstabilität des 32-mers aus, vgl. Kapitel 3.3.3.3). Da zwei photolabile Verknüpfungen vorliegen, verdoppelt sich die Wahrscheinlichkeit für den Photolyseprozess, der zur Aktivierung der DNA führt (doppelt so hoher Extinktionskoeffizient). Entsprechend sollte die reale Reaktionsrate der Startmaterial-Photolyse  $k_1$  etwa doppelt so hoch sein wie die der Photolyse der Zwischenprodukte  $k_2$ . Tatsächlich ist die Reaktionsrate  $k_2$  aus den Fits relativ fehlerbehaftet. Im oben verwendeten Modell werden Faktoren wie die Änderung der

Absorption während der Reaktion durch Auftreten der Photolysenebenprodukte (Nitroso-Spezies der Nitrobenzyl-Schutzgruppe) nicht berücksichtigt und auch die Anzahl der gemessenen Datenpunkte ist nicht ausreichend. Aus diesem Grund wurde der zweite Teilschritt der Folgereaktion in einem weiteren Experiment isoliert betrachtet. Hierzu wurde eine einfach NPBY-geschützte Benchmark-DNA mit Benzylazid zur Reaktion gebracht. Das daraus entstehende 2-(1-Benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)-1-(2-nitrophenyl)ethyl- (BTNPE) Schutzgruppenderivat entspricht strukturell dem Motiv des (halbierten) AMB-Bisazid-Linkers und eignet sich daher für einen direkten Vergleich mit dem einfach-entschützten 5-23 NPBY-AMB **CON2** (Abbildung 57).

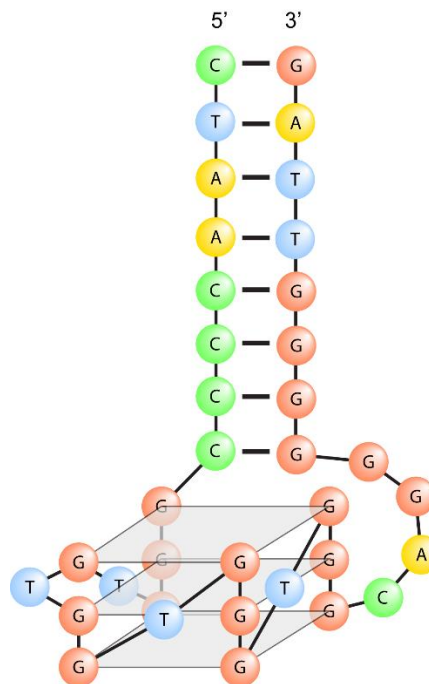


**Abb. 57** Photolyse der dT<sup>BTNPE</sup>-geschützten Benchmark-Sequenz mit getrennten Diastereomeren. Die Photolysereaktion kann mit einer Kinetik 1. Ordnung gefittet werden ( $k_{dia1} = 1.3 \pm 0.2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{dia2} = 0.9 \pm 0.2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ).

Die Photolyse unter identischen Bedingungen (Belichtungsapparatur, Photonenfluss, Probenmenge, Küvette, usw.) führte hierbei zu einer gemessenen Rate von  $k_{dia1} = 1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  für das früh eluierte und  $k_{dia2} = 0,9 \pm 0,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  für das spät eluierte Diastereomer (vgl. Kapitel 3.5). Beide Werte sind vergleichbar mit den Werten von  $k_2$  des 5-23 NPBY-AMB **CON2** und hinsichtlich der Hypothese im Rahmen des Fehlers etwa halb so groß wie  $k_1$ . Dies bedeutet, dass mit Hilfe der hier entwickelten Zyklisierungsstrategie nicht nur die Duplexstabilität langer Oligonukleotide effizient verringert, sondern gleichzeitig die Photolyseeffizienz bezüglich der Photoaktivierung des Oligonukleotids intrinsisch etwa verdoppelt werden kann.

### 3.3.4 Darstellung und Untersuchung eines bizyklisierten C10-Aptamers

Die Zyklisierungsstudien an der 32-mer Modell-DNA zeigten, dass die höchste Duplexdestabilisierung durch eine intrasequentielle Ringstruktur erreicht wird und bei dieser Oligonukleotidlänge eben nicht über eine End-zu-End-Zyklisierung. Aus diesem Resultat heraus ergab sich die Frage, ob auch ein besonders langes funktionelles Oligonukleotid durch intrasequentielle Zyklisierung photoaktivierbar modifiziert werden kann. Das C10-Aptamer ist ein 90-mer DNA-Aptamer, welches spezifisch gegen B-lymphoblastoide Suspensionszellen des humanen Burkitt-Lymphoms (Ramos-Zellen) bindet. Es wurde 2008 von Mayer *et al.* über eine Kombination von SELEX mit Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated Cell Sorting, FACS) identifiziert.<sup>[134]</sup> Mutationsbindungsstudien zusammen mit CD-spektroskopischen Studien am verkürzten Aptamer C10.36 legen nahe, dass für die Bindung an die Zelloberfläche eine Kombination aus Stammstruktur und dreilagigem, parallelem G-Quadruplex maßgeblich verantwortlich ist (Abbildung 58).<sup>[135]</sup>



**Abb. 58** Strukturmodell des verkürzten C10.36-DNA-Aptamers. Charakteristisches Strukturelement ist ein dreilagiger, paralleler G-Quadruplex mit Stammstruktur.<sup>[135]</sup>

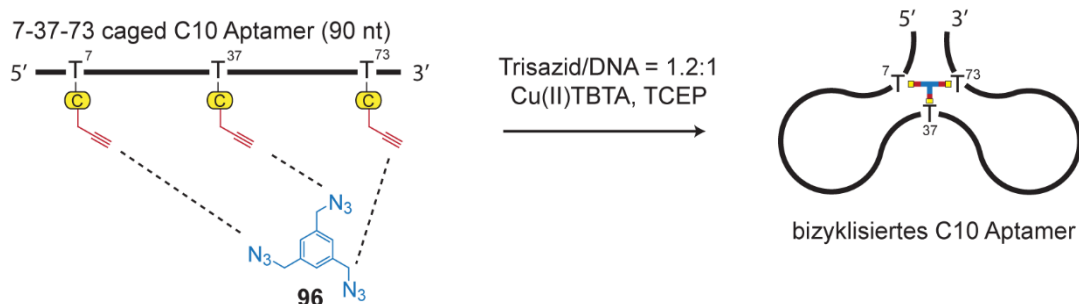
Über Mikroskopiestudien mit fluoreszenzmarkiertem C10.36, Transferrin und Dextran wurde darüber hinaus festgestellt, dass das C10-Aptamer über Clathrin-medierte Endozytose, d.h. Vesikelbildung in Ramos-Zellen aufgenommen wird.<sup>[135]</sup> Der Bindungspartner des C10-Aptamers auf der Zelloberfläche ist bislang unbekannt. Allerdings weist eine bislang unveröffentlichte Studie des Caris Research Institutes darauf hin, dass das C10.36-Aptamer durch Photoaffinitäts-Tags kovalent an Ribonukleoprotein-Komplexe bindet, die in einigen Tumorzellen typischerweise an der Zelloberfläche auftreten.<sup>[136]</sup> Dabei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Applikation des C10.36-Aptamers die Zellviabilität der Ramos-

Zellen spezifisch und dosisabhängig reduziert. Das C10-Aptamer besitzt auf diese Weise nicht nur diagnostisches, sondern auch ein hohes therapeutisches Potential.

In einer Kollaboration zwischen dem Arbeitskreis Heckel und dem Arbeitskreis Mayer der Universität Bonn sollte nun eine photoaktivierbare Variante des Vollängen-C10-Aptamers hergestellt und hinsichtlich des Bindeverhaltens gegen Ramos-Zellen untersucht werden.

5'- GCC TGT T<sup>7</sup>GT GAG CCT CCT AAC CCC GGG TGT GGT GGG T<sup>37</sup>GG GCA GGG GGG  
TTA GCA TCT CAC CAG CTC CGC ACA T<sup>73</sup>GC TTA TTC TTG TCT CCC -3'

(C10 Aptamer)



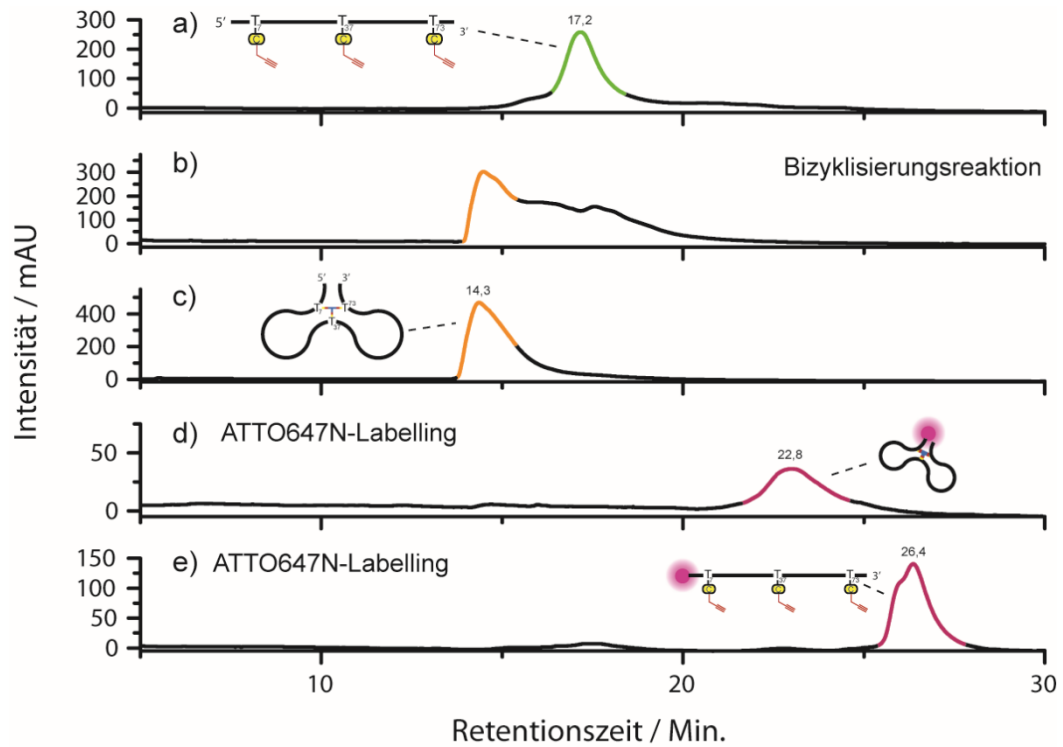
**Abb. 59** Schema der Bicyklisierung des C10-Aptamers durch CuAAC-Reaktion des dreifach NPBY-modifizierten C10-Aptamers mit dem tridentaten Azidlinker **96**.

Um eine möglichst weitreichende Ringspannung zu erhalten, die eine Sekundärstrukturbildung entlang der gesamten 90-mer Sequenz effektiv unterdrücken kann, wurden zunächst drei Alkin-„Anker“-Punkte an Position T7, T37 und T73 verteilt eingebaut. Da für die Bindungsstudien ein Fluoreszenzfarbstoff benötigt wurde, wurde das C10-Aptamer am 5'-Ende zusätzlich mit einer Amino-Modifikation versehen. Die durchschnittliche Kupplungsausbeute der Darstellung des dreifach-modifizierten C10-Aptamers betrug laut Tritylmonitor sehr gute 99,2%. Eine CuAAC-Reaktion des 7-37-73-caged C10 Aptamers mit dem Trisazid-Linker **96** sollte im nächsten Schritt zwei intramolekulare Ringschlussreaktionen eingehen und dabei eine bicyklisierte, geklammerte Struktur („photo-tether“) erzeugen (Abbildung 59). Beim ersten Zyklisierungsversuch wurde eine 1:1 Stöchiometrie zwischen Trisazid und DNA verwendet, bei einer DNA-Konzentration von etwa 10 µM. Als Resultat konnte hauptsächlich Startmaterial isoliert werden. Beim zweiten Versuch wurde die Stöchiometrie auf 1,2:1 Trisazid/DNA, sowie die DNA-Konzentration auf 15 µM erhöht. Hierbei konnte nach 18 Stunden Reaktionszeit im RP-HPLC-Chromatogramm eine Verbreiterung des Startmaterial-Peaks in Richtung früherer Retention beobachtet werden. Das Rohprodukt wurde in mehreren Aliquoten in die HPLC injiziert, sodass die Proben für verschiedene

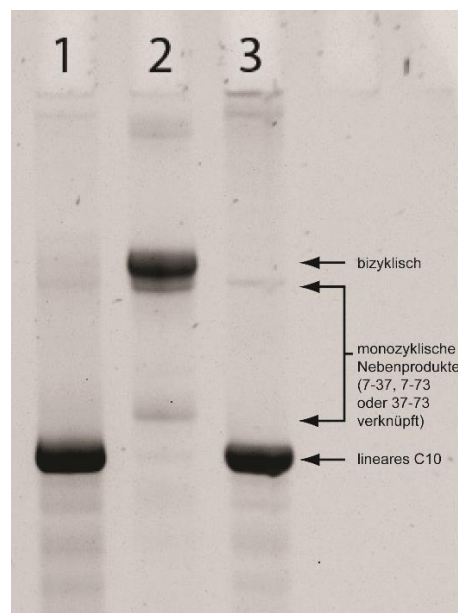
zusätzliche Zeiten in wässrigem TEAA-Puffer lagerten. Dabei wurde beobachtet, dass sich mit zunehmender Zeit eine frühere Fraktion in der RP-HPLC bildete, die einem Zyklisierungsprodukt entsprechen sollte. Offensichtlich war die Reaktion zuvor nicht initiiert worden und lief erst bei Resolvatation ab.

Allgemein betrachtet wird beim Falten des Aptamers in die aktive Struktur Energie freigesetzt. Durch Zyklisierung soll das Aptamer dagegen in energetisch ungünstigen Konformationen festgehalten werden, die erst durch Lichtbestrahlung in die stabile Form überführt werden. Bei Raumtemperatur kann das Aptamer aufgrund der teilkomplementären Elemente auch ohne Vorhandensein von stabilisierenden Kationen Sekundärstrukturelemente bilden. Dabei kann nicht nur die sterische Zugänglichkeit der Alkin-Funktionalitäten beeinträchtigt, sondern auch die konformationelle Zugänglichkeit der modifizierten Thymidin-Bausteine zueinander eingeschränkt werden. Um den konformationellen Raum des Aptamers während der Reaktion zu erhöhen, wurde die Zyklisierungsreaktion schließlich bei maßvoll erhöhten Temperaturen (40 °C) über Nacht wiederholt (höhere Temperaturen würden intermolekulare Reaktionen begünstigen). Auf diese Weise konnte per RP-HPLC-Monitoring eine Umsetzung von ca. 50% des Startmaterials (Abbildung 60 a) zu einer im Vergleich zum Startmaterial früher eluierenden Fraktion (orangefarbener Peak in Abbildung 60 b) erzielt werden. Die Fraktion bei ca. 14,3 Minuten Retentionszeit wurde durch zweimalige RP-HPLC aufgereinigt (Abbildung 60 c) und dann mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) analysiert (Abbildung 61). Hierbei zeigte sich zunächst, dass die bizyklisierte Spezies eine langsamere Migration im Gel aufweist als die linearen Spezies. Dies ist interessant, da eine Zyklisierung zunächst mit einer Verringerung der Molekülgröße assoziiert wird und somit besser durch das Gel migrieren sollte. Tatsächlich wurde von Seela *et al.* beobachtet, dass bei 9- und 18-mer DNA die zyklisierte Spezies eine schnellere Migration im Vergleich zur linearen aufweist.<sup>[116]</sup> Im Einklang mit den Ergebnissen des bizyklisierten C10-Aptamers zeigte ein längeres zyklisches 32-mer DNA dagegen eine langsamere Migration als die lineare 32-mer DNA. Das bizyklisierte 7-37-73 C10 Aptamer wies weitere Banden mit geringer Intensität auf, die aufgrund der Migrationshöhe den Produkten einer unvollständigen Zyklisierung (z.B. Monozyklisierung von Position 7-37, 37-73 und 7-73) zugeordnet werden können. Durch Belichten des bizyklisierten 7-37-73 C10 Aptamers mit 365 nm wird nur noch eine Bande beobachtet, die dieselbe Migration wie das lineare C10 Aptamer aufweist. Somit konnte auf Ebene von PAGE eine Photoaktivierung des bizyklisierten 7-37-73 C10 Aptamers bzw. eine Relinearisierung des bizyklisierten Aptamers demonstriert werden.



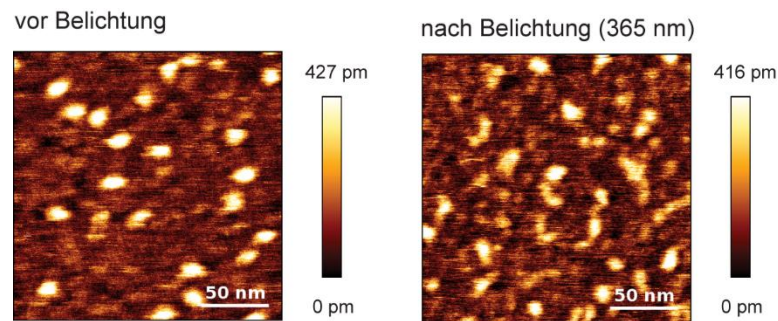


**Abb. 60** RP-HPLC-Chromatogramme der für die Bindungsstudien verwendeten Aptamer-Varianten (a) 7-37-73-caged C10 Aptamer, (b) das Reaktionsgemisch der Bicyklisierungsreaktion des 7-37-73-caged C10 Aptamers mit Trisazid **96**, (c) das aufgereinigte bicyklisierte 7-37-73 C10 Aptamer, (d) das 5'-ATTO647N-markierte bicyklisierte 7-37-73 C10 Aptamer und (e) das 5'-ATTO647N-markierte 7-37-73-caged C10 Aptamer zum Vergleich. Isolierte Fraktionen sind farbig hervorgehoben.



**Abb. 61** Denaturierendes PAGE-Experiment der C10-Aptamer-Varianten (1) lineares 7-37-73 caged C10 Aptamer, (2) bicyklisiertes 7-37-73 C10 Aptamer und (3) bicyklisiertes 7-37-73 C10 Aptamer nach Photolyse bei 365 nm.

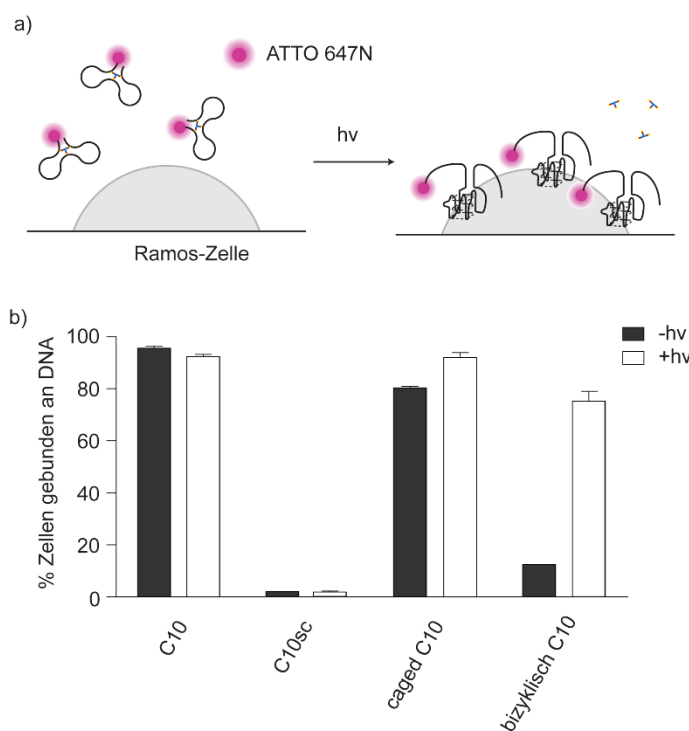
Da das 90-mer C10-Aptamer ein vergleichsweise langes Oligonukleotid darstellt, stellte sich die Frage, ob Informationen über die tatsächliche Struktur des bilyklierten C10-Aptamers mit Hilfe eines Atomkraftmikroskops (AFM) gewonnen werden können. In Zusammenarbeit mit Nikolai Grebenovsky, M. Sc. wurde daher eine Probe des bilyklierten 7-37-73 C10 Aptamers mittels AFM vor und nach Photolyse vermessen (Abbildung 62, Details siehe Experimenteller Teil 4.3).



**Abb. 62** AFM-Bilder des bilyklierten 7-37-73 C10 Aptamer vor und nach Belichtung (365 nm).

Wie erwartet, reicht die Auflösung des AFMs nicht aus, um die zyklisierten Strukturelemente der bilyklierten 7-37-73 C10 Aptamer-Sequenz abzubilden. Allerdings bildet sich das intakte bilyklierte 7-37-73 C10 Aptamer wie für eine geklammerte Struktur erwartet in den AFM-Studien als kompakte, kugelförmige Struktur ab. Durch Belichten wird die „Photo-Klammer“ des C10-Aptamers gelöst, wodurch das Aptamer flexibler wird. Entsprechend beobachtet man in den AFM-Studien des belichteten C10 Aptamers linearisierte Strukturen mit einem höheren Flexibilitätsgrad. Damit ist es zum ersten Mal überhaupt gelungen, die Photoaktivierung eines photolabil geschützten Oligonukleotids mit molekularer Auflösung zu visualisieren.

Im nächsten Schritt wurde das An/Aus-Schaltverhalten des bilyklierten C10-Aptamers auf Ebene der Bindungsaffinität gegenüber Ramos-Zellen untersucht. Hierzu wurde ein ATTO647N-Fluoreszenzmarker über eine NHS-Ester-Amin-Kupplung an das 5'-Ende des bilyklierten C10-Aptamers angebracht. Zu Vergleichszwecken wurde auch die lineare 7-37-73 caged C10-Aptamer Variante auf diese Weise modifiziert. Die Zellbindungsexperimente und Mikroskopiestudien wurden in Kollaboration mit Laura Eiden, M. Sc. vom Arbeitskreis Mayer (Universität Bonn) durchgeführt. Ramos-Zellen wurden mit je einer 200 nM Lösung (1x HBSS-Puffer + 1,4 mM  $MgCl_2$ ) des nativen C10 (Positivkontrolle), einer Zufallssequenz C10sc (Negativkontrolle), des 7-37-73 caged C10-Aptamers und des bilyklierten 7-37-73 C10-Aptamer für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Anteil C10-gebundener und nicht-gebundener Zellen per Durchflusszytometrie (FACS) ermittelt.

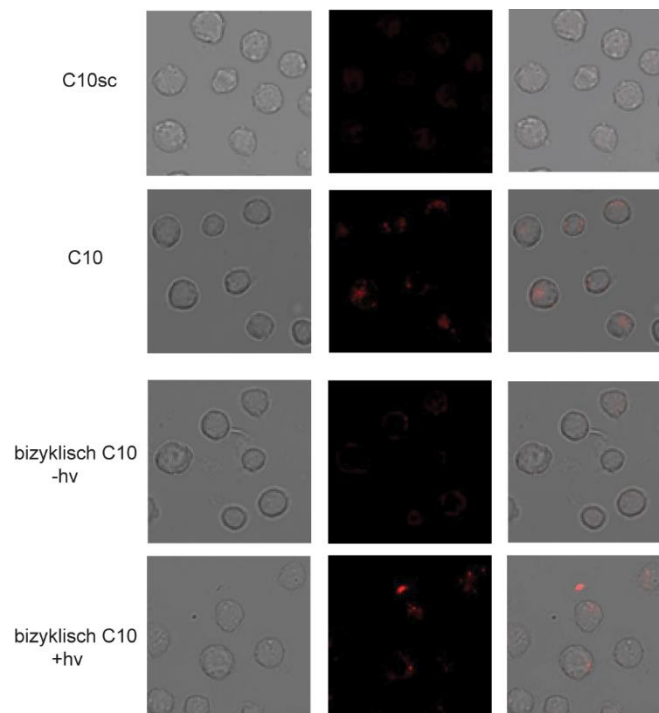


**Abb. 63** (a) Schema der Photoaktivierung des bilyklisierten 7-37-73 C10-Aptamers. Um die Bindung des Aptamers an Ramos-Zellen vor und nach Belichten zu quantifizieren wurde ein ATTO647N Fluoreszenzmarker ans 5'-Ende der Aptamere angefügt. (b) Ergebnisse der Bindungsstudien. Der Anteil gebundener C10-gebundener Ramoszellen wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) gemessen.

Das native Aptamer zeigt bei den gewählten Konzentrationen fast vollständige Bindung, wohingegen die Negativkontrolle keine Bindung aufweist (Abbildung 63 b). Das 7-37-73 caged C10-Aptamer weist eine fast so hohe Bindung auf wie die C10-Positivkontrolle. Eine Verteilung von multiplen photolabilen Schutzgruppen entlang der 90-mer DNA-Sequenz führt somit zu einer hohen Hintergrundaktivität. Dies ist insbesondere immer dann der Fall, wenn die Struktur eines funktionellen Oligonukleotids nicht bekannt ist oder, wie häufig der Fall, keine geeigneten „Schlüssel“-Nukleotide existieren, deren gezieltes Schützen bereits die volle Funktionalität inhibiert.<sup>[137]</sup> Demgegenüber weist das bilyklisierte 7-37-73-Aptamer nur noch eine Bindung nahe dem Niveau der Negativkontrolle auf (ca. 29%). Offensichtlich führt das Verknoten des Volllängen-Aptamers mit einer „Photo-Klammer“ zu einer deutlich effektiveren Unterdrückung der Faltung des Aptamers in seine funktionelle G-Quadruplex-Struktur. Die Bindungsstudien wurden ebenfalls nach Photolyse (365 nm) der jeweiligen C10-Aptamer-Variante durchgeführt. Die Bindung der Positiv- und Negativkontrolle bleibt dabei im Rahmen des Fehlers unbeeinflusst. Das entschützte 7-37-73 caged C10-Aptamer weist volle Aktivität nach Belichten auf und auch das entschützte bilyklisierte 7-37-73 C10-Aptamer besitzt nach Belichten eine Aktivität nahe der Positivkontrolle. Aufgrund der geringen verfügbaren

Probenmenge wurde in den Bindungsstudien nicht die Abhängigkeit der Photomodulation von der Belichtungsdosis untersucht. So könnte beispielsweise die nicht vollständige Reaktivierung des belichteten bizyklisierten C10-Aptamers auf eine unvollständige Photolyse zurückgeführt werden. Eine alternative Erklärung hierfür ist, dass durch die kovalente Bizyklisierung alternative Faltungen bzw. Wasserstoffbrückenbindungen des 90-mers stabilisiert wurden, die nach Belichten für die Faltung der aktiven G-Quadruplex-Stammstruktur zunächst gebrochen bzw. neugebildet werden müssen. Da die belichteten Aptamer-Proben vor der Inkubation mit den Zellen nicht noch einmal erhitzt und damit denaturiert wurden, könnte die nicht vollständige Reaktivierung des bizyklisierten C10-Aptamers auf eine langsame Umfaltungskinetik zurückgeführt werden. Ein ähnlicher kinetischer Effekt wurde in dieser Doktorarbeit auch bei Belichtungsexperimenten von doppelsträngiger DNA in Schmelzpunktmessungen beobachtet, bei denen trotz vollständiger Photolyse der Schutzgruppen die erste Schmelzpunktkurve beim Aufheizvorgang aus zwei Wendepunkten zusammengesetzt war, in allen weiteren Experimenten jedoch nur noch der Schmelzpunkt der nativen DNA beobachtet wurde.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien wurden schließlich durch Mikroskopiestudien bestätigt (Abbildung 64). Das ATTO647N-markierte bizyklisierte 7-37-73 C10-Aptamer wird vor Belichten nicht an Ramos-Zellen gebunden. Nach Belichten dagegen wird das aktivierte C10-Aptamer gebunden und vermutlich über einen Clathrin-medierten Endozytose-Mechanismus in das Zellinnere transportiert.



**Abb. 64** Epifluoreszenz-Bilder von Ramos-Zellen, die jeweils mit ATTO647N-markiertem C10-Aptamer (Positivkontrolle), C10sc (Negativkontrolle) und dem bizyklisierten 7-37-73 C10-Aptamer vor und nach Belichten bei 365 nm angefärbt wurden.

### 3.3.5 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Projektteil ist es gelungen, photospaltbare Alkin-Funktionalitäten an der Watson-Crick-Basenseite von DNA-Oligonukleotiden anzubringen und diese mit Hilfe einer CuAAC Click-Reaktion intrasequentiell mit einem Bisazid-Linker zu zyklisieren. Ausgehend von einem Syntheseprotokoll der intermolekularen Verknüpfung von Oligonukleotiden mittels CuAAC wurde ein zuverlässiges Protokoll erarbeitet, mit dem zyklisierte Oligonukleotide in typischen Ausbeuten von 40-60% nach Aufreinigung erhalten werden können. Es konnte gezeigt werden, dass die intrasequentielle Zyklisierung von DNA mit einer drastischen Destabilisierung der DNA-Duplexstruktur einhergeht. Dabei ist auch die Ökonomie der photolabilen Schutzgruppen weitaus günstiger als beim Einsatz multipler Schutzgruppen, sodass weniger Bestrahlungsdosis für eine vollständige Photolyse appliziert werden muss. Durch Variation verschiedener Zyklisierungsparameter wurde eine optimale Zyklisierungsstrategie erarbeitet. Dabei zeigte sich, dass Linkerlänge, -flexibilität und -polarität, sowie die Art der photolabilen Schutzgruppe eine untergeordnete Rolle für die Duplexstabilität zyklisierter DNA spielen. Wohl aber hängt die Duplexdestabilisierung von der Ringgröße ab, die in den hier untersuchten Beispielen optimalerweise in einem Bereich zwischen 11 und 21 Nukleotiden liegt. Gerade für längere Oligonukleotide zeigte sich deswegen, dass eine End-zu-End-Zyklisierung, wie sie zuvor in der Literatur ausschließlich bekannt war, keine ausreichende Ringspannung produziert und damit der intrasequentiellen Zyklisierung in der Effizienz des An/Aus-Schaltverhaltens nachsteht. Mit dem Ziel eine besonders lange funktionelle DNA photoaktivierbar zu modifizieren wurde das 90-mer C10-Aptamer, welches selektiv gegen maligne Ramos-Zellen bindet und von diesen aufgenommen wird, mit drei photolabilen Alkin-Modifikationen und einem tridentaten Linker bilyklisiert. Sowohl in durchflusszytometrischen Bindungsstudien als auch mit der molekularen Auflösung von Atomkraftmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die auf diese Weise „geklammerte“ Aptamer-Struktur effizient photomoduliert werden kann, während eine multipel photolabil geschützte Variante eine sehr geringe Photomodulation aufzeigte. Die Lichtaktivierung der Bindungsaffinität und der Aufnahme des therapeutisch interessanten C10-Aptamers in Ramos-Zellen konnte weiterhin mittels Mikroskopiestudien belegt werden. Obschon die Wirkungsweise des C10-Aptamers höchstwahrscheinlich auf der Wechselwirkung einer gefalteten G-Quadruplex-Stamm-Struktur beruht, eignet sich das hier entwickelte Zyklisierungskonzept insbesondere für solche funktionellen Oligonukleotide, bei denen die Struktur nicht bekannt ist oder bei denen eine „Schlüssel“-Modifikationsstelle nicht existiert. Das bilyklisierte photolabile 90-mer C10-Aptamer stellt nach bestem Wissen das längste, jemals in einer definierten Weise photolabil geschützte Oligonukleotid dar. In zukünftigen Arbeiten lässt sich das Konzept der intrasequentiellen Zyklisierung photoaktivierbarer DNA-Oligonukleotide nun mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf den vollen Längenbereich der DNA- und RNA-

Festphasensynthese übertragen. Darüber hinaus ergibt sich in Kombination mit enzymatischen Methoden wie der Ligation die Möglichkeit noch längere funktionelle Oligonukleotide herzustellen, beispielsweise zur Untersuchung der Faltungskinetik von Riboswitches und anderer bistabiler Oligonukleotide.

### 3.4 Photoaktivierbare zyklisierte Oligonukleotide (Phosphatrückgrat-Strategie)

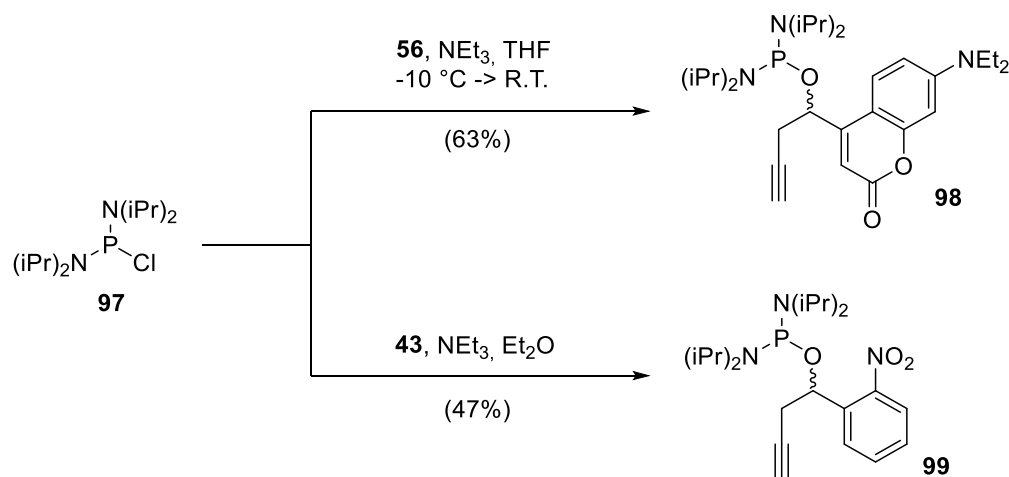
#### 3.4.1 Einleitung

Für die Zyklisierungsstrategie entlang der Watson-Crick-Basenseite (Kapitel 3.3) ist es notwendig, jede kanonische Nukleobase individuell mit einer photolabilen Alkin-Modifikation auszustatten und dann in einen Phosphoramidit-Baustein umzusetzen, der für die Festphasensynthese von Oligonukleotiden verwendet werden kann. Um ein vollständiges Set von modifizierten DNA und RNA-Amiditen zu erhalten, sind dafür insgesamt 52 Einzelreaktionen notwendig, wobei die Synthese der DNA-Bausteine jeweils sechs, die der RNA-Bausteine jeweils sieben konsekutive Reaktionsschritte beinhaltet. Bei Gesamtausbeuten von teilweise <5% wird es zu einer Herausforderung, große Mengen an Phosphoramidit-Bausteinen für umfangreiche DNA- und RNA-Studien zur Verfügung zu stellen. Wie in Kapitel 3.3 demonstriert, ist die durch die Zyklisierung hervorgerufene Duplexdestabilisierung eine effiziente Strategie für das Design langer photoaktivierbarer Oligonukleotide. Während photolabile Schutzgruppen üblicherweise an der Watson-Crick-Basenseite angebracht werden, um eine lokale Störung der Wasserstoffbrückenbindungen zu bewirken, hat die duplexdestabilisierende Wirkung der Zyklisierung einen globalen Charakter. Die für die Zyklisierung notwendigen photolabilen Alkin-Funktionalitäten müssen deswegen nicht notwendigerweise an der Nukleobase angebracht werden, sondern können wie in Kapitel 1.2.1 diskutiert, u.a. auch an der Rückseite der Nukleobasen, am Zuckerbaustein oder am Phosphatrückgrat verknüpft sein. Letztere Strategie ist synthetisch besonders einfach zugänglich, da sich theoretisch die in der Phosphoramidit-Chemie übliche Cyanoethyl-Schutzgruppe direkt durch einen persistenten Alkylrest bzw. durch eine photolabile Schutzgruppe ersetzen lässt. Dies bedeutet, dass für die Synthese der photolabilen Alkin-modifizierten Phosphoramidite lediglich ein universelles photolabil geschütztes Phosphitylierungsreagenz hergestellt werden muss, welches anschließend in einem Schritt mit sämtlichen kommerziell erhältlichen DNA- und RNA-Nukleosiden mit freier 3'-OH-Gruppe gekuppelt werden kann. Der zuvor große synthetische Aufwand von sechs bzw. sieben Nukleosid-Reaktionsschritten pro Nukleobase würde damit auf einen einzigen Kupplungsschritt reduziert. Dies würde aus Sicht der Synthese einen wichtigen Grundstein für Strukturuntersuchungen, sowie insbesondere für therapeutische Anwendungen zyklisierter (Antisense-)Oligonukleotide bedeuten, für die üblicherweise große Mengen an Material benötigt werden. Das seiten-spezifische Anbringen photolabiler Schutzgruppen am Phosphatrest war vom Beginn dieser Doktorarbeit an geplant, jedoch zu Gunsten der Zyklisierungsstrategie entlang der Watson-Crick-Basenseite zunächst hinten angestellt. In der Zwischenzeit wurde 2014 von Wu *et al.* der Einbau NPE-geschützter Phosphate in eine siRNA berichtet, bei der die photolabile Schutzgruppe ebenso die Cyanoethyl-Schutzgruppe ersetzt.<sup>[46]</sup> Interessanterweise ist die Photomodulation der Wechselwirkung von siRNA und

RISC-Komplex in dieser Studie gescheitert. Als Ursache konnte hierbei eine Hydrolyse der photolabilen Schutzgruppe am Phosphatrückgrat evaluiert werden. Die Autoren stellten hierbei aber fest, dass die Hydrolyse ausschließlich Phosphatbrücken betrifft, die sich in der stabilen Doppelhelixstruktur befinden, vermutlich weil in dieser starren Geometrie ein nukleophiler Angriff des Wassers begünstigt wird. Demgegenüber wurden photolabil modifizierte endständige Phosphatbrücken nicht hydrolysiert. Diese Ergebnisse stellten eine große Motivation für die Entwicklung einer Zyklisierung entlang des Phosphatrückgrats dar, da gerade im zyklisierten Zustand keine Doppelhelixstruktur gebildet und die Hydrolyse somit unterdrückt werden sollte. Der folgende Projektteil beschäftigt sich aus diesem Grund mit der Synthese geeigneter photolabil und Alkin-modifizierter Phosphitylierungsreagenzien, deren Kupplung mit verschiedenen DNA- und RNA-Nukleosidbausteinen, den Einbau in Oligonukleotide sowie schließlich deren Zyklisierung mittels CuAAC-Reaktion. Eines dieser Oligonukleotide ist die AntimiR-34a, welche in zukünftigen *in vivo* Studien zur Photoregulation der Apoptose in Herzmuskelgewebe im Zuge eines Myokardinfarkts eingesetzt werden soll.

### 3.4.2 Synthese der photolabil geschützten Phosphoramidit-Bausteine

Die Synthese des photolabil geschützten Alkin-modifizierten NPBY-Phosphordiamidits **99** wurde angelehnt an eine Vorschrift von Lietard *et al.* durchgeführt (Abbildung 65).<sup>[115]</sup>



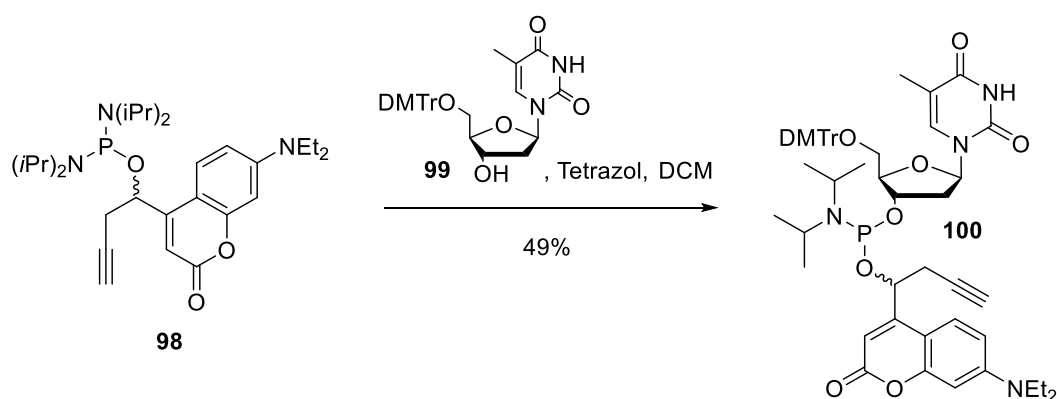
**Abb. 65** Synthese des photolabil geschützten Alkin-modifizierten DEACBY-Phosphordiamidits **98** und des NPBY-Phosphordiamidits **99**

Hierbei findet eine Substitution des Chlor-Substituenten am Phosphor durch das Alkohol-Derivat der NPBY-Schutzgruppe statt. Trotz Deaktivieren des Kieselgels im Zuge der säulenchromatographischen Aufreinigung mit 1 Volumen-% Triethylamin wurde eine deutliche Zersetzung des Produkts beobachtet, sodass das Reaktionsprodukt der nukleophilen Substitution in nur 47% Ausbeute erhalten wurde. Die Synthese des photolabil geschützten



Alkin-modifizierten DEACBY-Phosphordiamidits **98** wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von Wu *et al.* durchgeführt, bei der das Reaktionsprodukt nach erfolgreicher Reaktion ausfällt und direkt für die Kupplung mit einem Nucleosid weiter eingesetzt werden kann.<sup>[46]</sup> Für eine saubere Charakterisierung der Verbindung wurde eine säulenchromatographische Aufreinigung von Verbindung **98** durchgeführt, nach welcher das Reinprodukt in 63% Ausbeute erhalten werden konnte.

Im nächsten Schritt mussten Verbindung **98** und **99** als Phosphitylierungsreagenzien mit Nucleosid-Bausteinen mit freiem 3'-OH gekuppelt werden. Erste Versuche der Kupplung des NPBY-Derivats **99** an ein geschütztes Desoxyadenosin-Nucleosid ergaben zunächst keine positiven Resultate. Deswegen und vor allem aufgrund der besseren photochemischen Eigenschaften lag der Fokus im weiteren Verlauf nur auf dem DEACBY-Derivat **98**.



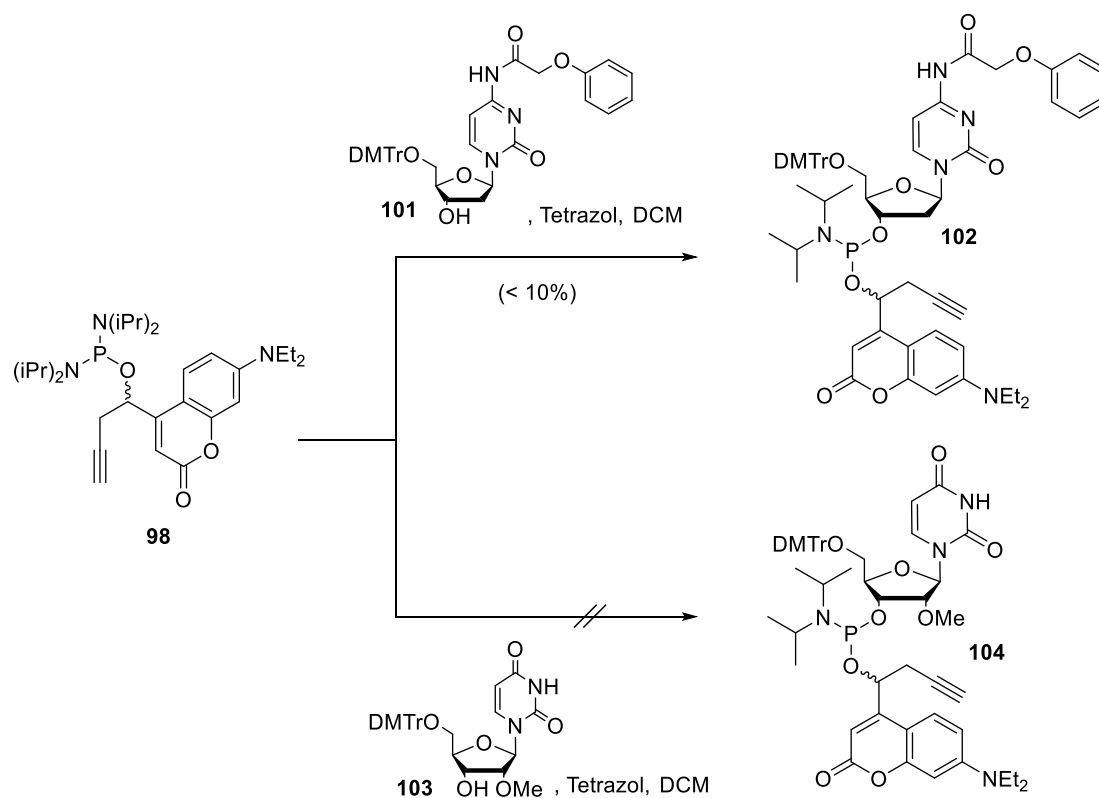
**Abb. 66** Synthese des photolabil geschützten Alkin-modifizierten DEACBY-Thymidin-Phosphoramidits **100** über eine Tetrazolaktivierung mit anschließender Substitution

Die Kupplung wurde zunächst mit einem kommerziell erhältlichen Thymidin-Nucleosid (5'-DMTr-geschützt) getestet, da hier die wenigsten sterischen Komplikationen zu erwarten waren. Beim ersten Syntheseversuch von Phosphoramidit **100** in Anlehnung an ein Protokoll von Wu *et al.* wurde Tetrazol zusammen mit dem Rohprodukt DEACBY-Phosphordiamidit **98** in einem leichten Überschuss des Tetrazols vorgelegt und hierzu eine Suspension des Thymidin-Bausteins langsam zugetropft. Die Reaktionskontrolle per Dünnschichtchromatographie zeigte hierbei nach 20 Stunden Reaktionszeit eine signifikante Bildung einer fluoreszierenden Produktfraktion an, die positiv auf eine Anisaldehyd-Färbung reagierte (Nachweis des Zuckers). Ebenfalls zeigte eine NMR-spektroskopische Untersuchung, dass das isolierte Hauptprodukt der Reaktion über alle Cumarin-Signale, sowie über alle erwarteten Signale des Thymidin-Bausteins verfügte. Jedoch waren die Signalintegrale der Cumarin-Protonen allesamt nur etwa halb so groß wie die der Thymidin-Protonen. Im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum wurden zwei Signale bei 138.7 und 139.1 ppm beobachtet. Allerdings sollte das Phosphor-Signal wegen der Chiralität der DEACBY-Schutzgruppe und

des Phosphorzentrums in vier Signale aufspalten. Dieser Befund konnte nur erhalten werden, wenn das Produkt der Reaktion am Phosphor-Zentrum symmetrisch substituiert vorläge. Das Signalintegralverhältnis von Thymidin-Protonen zu Cumarin-Protonen von 2:1 lässt schließlich die Schlussfolgerung zu, dass die Tetrazolaktivierung bei der gewählten Reaktionsdurchführung zweimal erfolgt ist und damit durch Zweifachsubstitution ein symmetrisches Thymidin-Phosphit-Dimer erzeugt wurde.

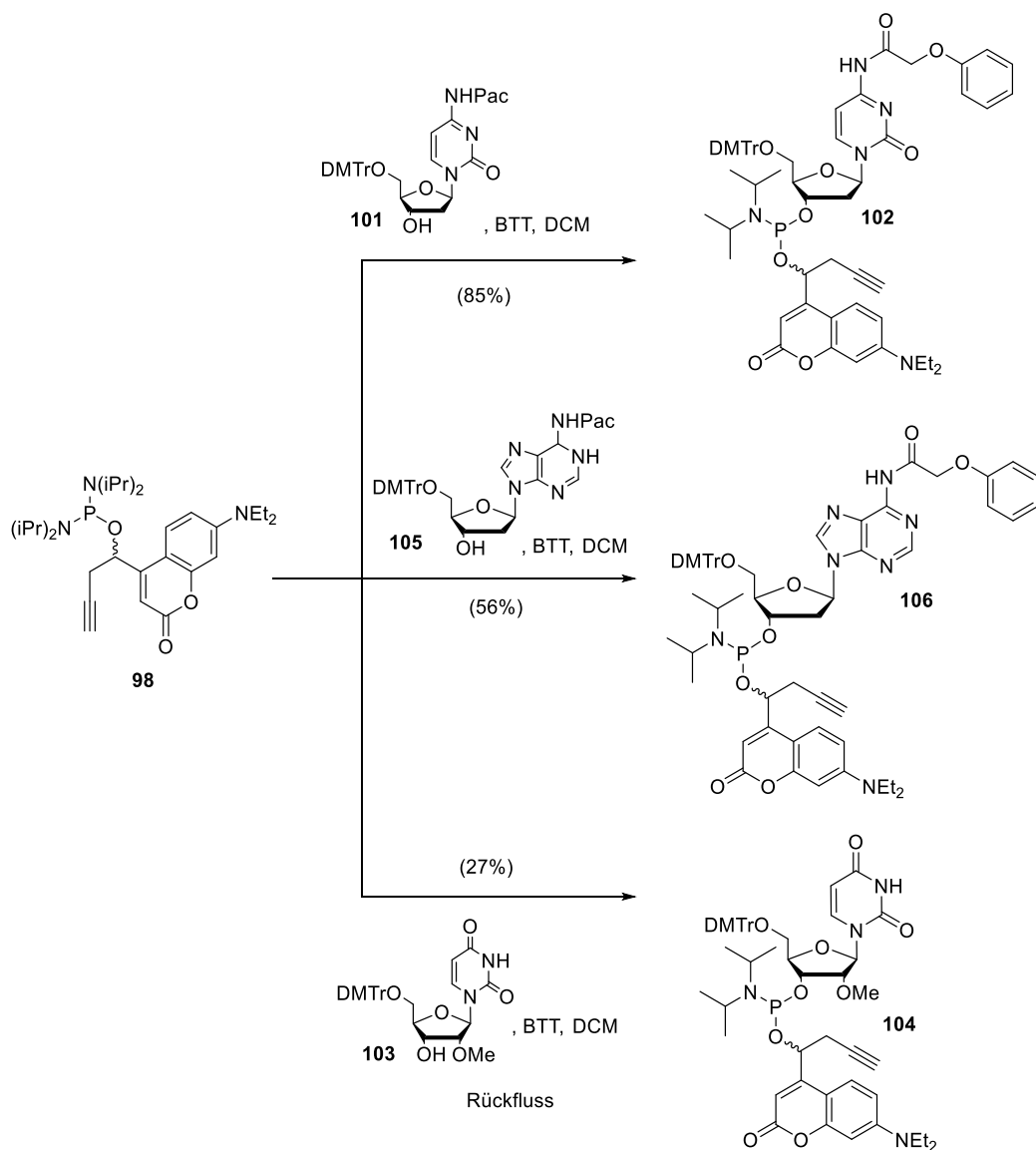
Aufgrund dieses Resultats wurde die Reaktionsdurchführung abgeändert, sodass ähnlich der Bedingungen im Zyklus der Festphasensynthese der Zuckerbaustein suspendiert vorgelegt wurde und das DEACBY-Phosphordiamidit **98** zusammen mit diesmal weniger als einem halben Äquivalent Tetrazol (ca. 0,14 M in dieser Lösung) langsam unter Eiskühlung dazugetropft wurde. Durch einen Überschuss des Katalysators Tetrazols sollte der Reaktionspfad zum Thymidin-Dimer unterdrückt werden. Tatsächlich verlief die Reaktion auf diese Weise selektiv zum monosubstituierten Phosphoramidit **100**, welches mit einer guten Ausbeute von 49% isoliert werden konnte (Abbildung 66).

Im nächsten Schritt sollte das Kupplungsprotokoll auf weitere DNA- und RNA-Bausteine übertragen werden (Abbildung 67). Eine analoge Umsetzung von DEACBY-Phosphordiamidit **98** mit einem UltraMILD<sup>®</sup>-geschützten 2'-Desoxy-NH-PAC-Cytidin-Nukleosid **101** ergab dabei eine Reaktionsausbeute von weniger als 10%. Die Umsetzung mit einem Uridin-Nukleosid **103** führte zu keiner isolierbaren Produktausbeute. Neben dem Startmaterial konnte im Fall der Uridin-Umsetzung jedoch eine signifikante Menge einer neuen Phosphoramidit-Spezies isoliert werden, die im <sup>1</sup>H-NMR die Substitution eines der beiden Diisopropylaminreste, jedoch keine Kupplung mit einem Zuckerbaustein anzeigte. Stattdessen wurde ein einzelnes neues Proton, welches in vier Einzelsignale aufspaltete, beobachtet (8.46, 8.19, 5.89 und 5.65 ppm). Es wurde daher vermutet, dass hier eine Tetrazol-aktivierte Phosphoramidit-Spezies isoliert wurde. Das Tetrazol besitzt genau ein Proton, welches aufgrund der hohen räumlichen Nähe sowohl zum asymmetrischen Phosphor-, als auch zum chiralen Zentrum der DEACBY-Schutzgruppe im Einklang mit dem Beobachten eines Satzes aus vier Singulett-Signalen mit teilweise starker Verschiebung im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum gefunden werden könnte.



**Abb. 67** Synthese des photolabil DEACBY-geschützten Ultramild® dC<sup>Pac</sup>-Bausteins **102** und des 2'-O-Methyl-RNA-2'-OMeU-Bausteins **104** mit Tetrazolaktivierung

Wenn nun also die Aktivierung des Phosphorzentrums erfolgreich war, so musste das Problem bei der Kupplung des Uridin-Bausteins, sowie vermutlich auch des Cytidin-Bausteins im zweiten Schritt der nukleophilen Substitution liegen. Dies ist nicht verwunderlich, da das Nukleophil ein sperriger sekundärer Zucker-Alkohol ist, welcher gegenüber dem vormals erfolgreich gekuppelten Thymin-Baustein im Falle des Uridin-Bausteins eine zusätzliche sterische Abschirmung über die 2'-Methoxy-Gruppe erfährt. Da die Nukleophilie der 3'-OH-Gruppe der Zuckerbausteine nicht direkt erhöht werden kann, ohne das Zuckergerüst zu modifizieren, wurde probiert, die Nukleofugazität der Abgangsgruppe, also des Tetrazols, zu erhöhen. In der Festphasensynthese finden Tetrazol-Derivate wie 5-(Ethylthio)-1*H*-tetrazol (ETT) und 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (BTT) als alternative Aktivator-Reagenzien häufig Anwendung. Sie weisen einen niedrigeren  $pK_a$  als Tetrazol auf und sind damit bessere Abgangsgruppen im Kupplungsschritt.



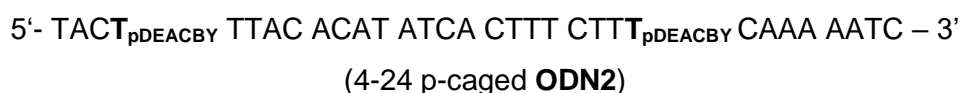
**Abb. 68** Synthese des photolabil DEACBY-geschützten UltraMILD<sup>®</sup> dC<sup>Pac</sup>-Bausteins **102**, des 2'-O-Methyl-RNA- 2'-OMeU-Bausteins **104** sowie des UltraMILD<sup>®</sup> dA<sup>Pac</sup>-Bausteins **106** unter Verwendung von BTT als Aktivator

In Anlehnung daran wurde die Kupplungsreaktion des dC-Bausteins **101** mit BTT als Aktivator wiederholt (Abbildung 68). Tatsächlich konnte die Reaktionsausbeute hierbei von weniger als 10% auf 85% gesteigert werden. Auch die Synthese des analogen UltraMILD<sup>®</sup> geschützten dA<sup>PAC</sup>-Bausteins **106** gelang mit einer guten Ausbeute von 56%. Die Umsetzung des 2'-Methoxy-RNA-Bausteins Uridin **103** blieb jedoch auch mit BTT zunächst ohne Produktbildung. Aus diesem Grund wurde schließlich die Reaktionstemperatur bis zum Sieden des Dichlormethans erhöht, mit der Absicht, die Energiebarriere der nukleophilen Substitution dadurch zu überwinden. Hierdurch konnte erstmals auch der 2'-Methoxy-RNA-Baustein Uridin **103** in das photolabil geschütztes Phosphoramidit **104** überführt werden, wobei neben der Reisolierung von Startmaterial eine noch eher niedrige Reaktionsausbeute von 27% erreicht wurde. Da Phosphoramidite als recht labil gelten, zumal wenn mit einer photolabilen

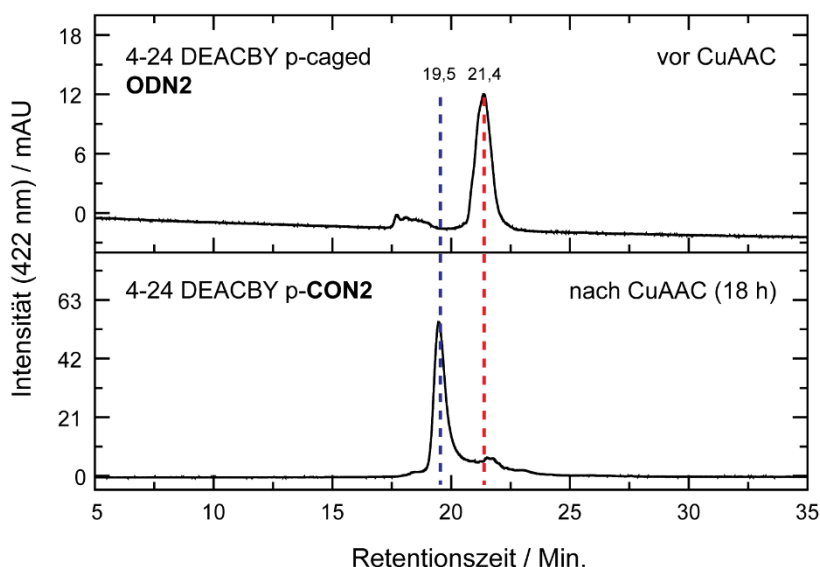
Schutzgruppe versehen, wurde eine weitere Temperaturerhöhung zur Ausbeuteerhöhung bislang nicht getestet. Diese dürfte aber zu einer schnelleren und höheren Reaktionsausbeute führen. Insbesondere müsste hierfür das Lösungsmittel von DCM beispielsweise durch höhersiedendes Acetonitril ersetzt werden.

### 3.4.3 CuAAC-Zyklisierung von Oligonukleotiden über das Phosphatrückgrat

DEACBY-Thymidin-Phosphoramidits **100** wurde daraufhin für die Festphasensynthese der 32-mer Modell-DNA (siehe Kapitel 3.3.3) verwendet und an Position 4 und 24 der Sequenz eingebaut.

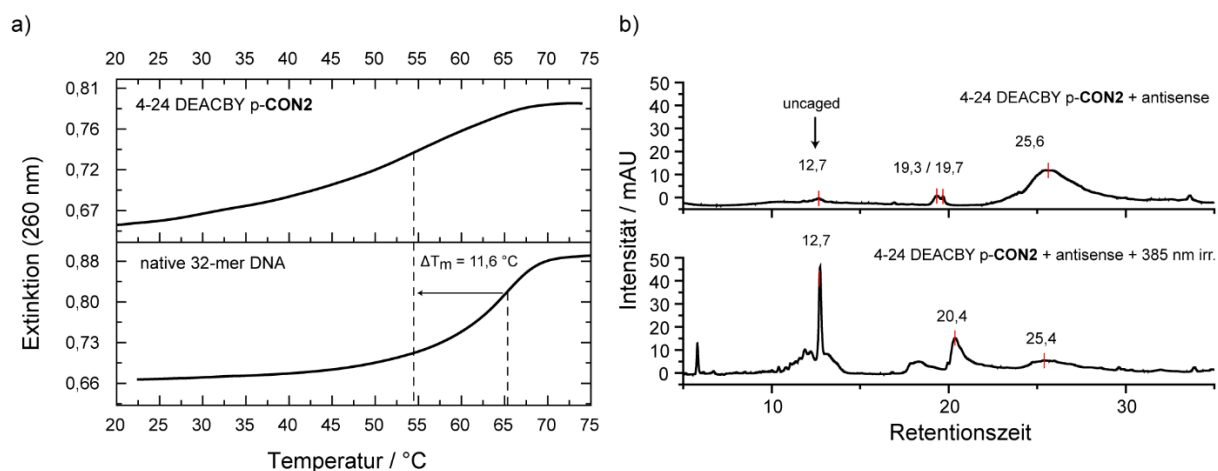


Gegenüber den Phosphoramiditen mit photolabiler Modifikation an der Nukleobase zeigte Phosphoramidit **100** eine herabgesetzte Löslichkeit in Acetonitril, sodass die verwendete 0,12 M Lösung von **100** in Acetonitril bereits über dem Löslichkeitsprodukt lag und während der Festphasensynthese zur Bildung eines störenden Bodensatzes führte. Entsprechend verlief die Kupplungsreaktion des Phosphoramidits **100** mit Ausbeuten zwischen 60 und 80% und führte zu einer relativ niedrigen Gesamtausbeute von etwa 40% gemäß Tritylmonitor. Eine mögliche Lösung dieses Problems ist die Zugabe von DCM als Kosolvenz, was im weiteren Verlauf des Projekts dann auch erfolgreich durchgeführt wurde. Nach Abspaltung von der festen Phase und Entfernen der 5'-DMTr-Schutzgruppe wurde das fertige Oligonukleotid mit DEACBY-Modifikation an den 4-24-Phosphaten (4-24 DEACBY p-caged **ODN2**) durch CuAAC-Reaktion mit dem AMB-Bisazid-Linker **93** zyklisiert (44% Ausbeute nach Aufarbeitung). Wie in Abbildung 68 gezeigt, verschiebt sich die Retentionszeit des zyklischen Oligonukleotids 4-24 DEACBY p-**CON2** von 21,4 Minuten zu früheren Zeiten (19,5 Minuten). Dieses Ergebnis ist konsistent zu den Resultaten der Zyklisierungsstudien entlang der Watson-Crick-Basenseite und weist auf das Vorliegen einer zyklisierten Spezies hin. Eine massenspektrometrische Analyse bestätigte die Kupplung des Bisazid-Linkers, auf eine Kontrollreaktion zum Nachweis der Zyklisierung wurde an dieser Stelle mit Verweis auf die Ergebnisse in Kapitel 3.3.3 verzichtet.



**Abb. 69** RP-HPLC-Chromatogramme vor und nach Zyklisierung (Reaktionsgemisch nach 18 h) des 4-24 DEACBY p-caged ODN2 mittels CuAAC und AMB-Bisazid-Linker **93**

Im nächsten Schritt wurde eine Schmelzpunktbestimmung für das zyklisierte 4-24 DEACBY p-**CON2** durchgeführt, um den Einfluss der Zyklisierung entlang des Phosphatrückgrats auf die Duplexstabilität zu untersuchen (Abbildung 70a). Der Schmelzpunkt des phosphatzyklisierten 4-24 p-**CON2** liegt bei 54,1 °C. Dies entspricht einer gegenüber der nativen 32-mer DNA um  $\Delta T_m = 11,6$  °C erniedrigten Schmelztemperatur.



**Abb. 70** (a) Schmelzpunktstudien am zyklisierten 4-24 DEACBY p-CON2 vor und nach Belichtung mit 405 nm. (b) RP-HPLC-Chromatogramme derselben Proben vor und nach Belichtung mit 385 nm. dsDNA 4-24 DEACBY p-CON2 (25,6 Min.), uncaged/natives 32-mer dsDNA (12,7 Min.).

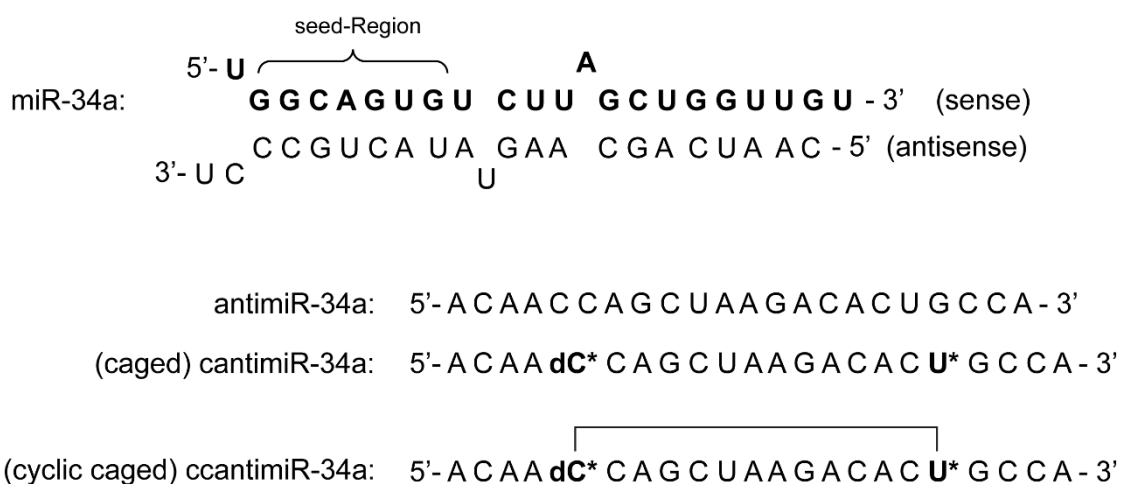
Um auszuschließen, dass bei der Schmelzpunktbestimmung des zyklisierten 4-24 DEACBY p-**CON2** nicht zwei Übergänge direkt hintereinander auftreten (z.B. durch eine zweite Oligospezies, die aus einer potentiellen Hydrolyse resultiert) und zu einer Abflachung des

sigmoidalen Kurvenverlaufs führen, wurde die Probe nach jeweils vier Aufheiz- und Abkühlvorgängen (20-80 °C) in 1xPBS-Puffer nach insgesamt ca. 16 Stunden mittels RP-HPLC analysiert (Abbildung 70 b). Dabei ergab sich neben einer geringen Menge Einzelstrang (19,3/19,7 Min.) lediglich ein breiter Hauptpeak, der die typische Absorptionsbande der DEACBY-Schutzgruppe bei 380-420 nm aufwies. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot der Probe bei 385 nm belichtet und ebenfalls per RP-HPLC analysiert. Hierbei zeigte sich die Bildung eines scharfen Peaks bei 12,7 Minuten, welcher aufgrund der fehlenden DEACBY-Absorptionsbande das native dsDNA-Photolyseprodukt darstellt. Da dieses Produkt nicht im Zuge der Schmelzpunktbestimmung entstanden ist, Photolyse- und Hydrolyseprodukt jedoch identisch wären, kann geschlussfolgert werden, dass die hier dargestellte Phosphat-zyklisierte DNA im Gegensatz zu den linearen Phosphat-geschützten siRNA-Oligonukleotiden aus der Studie von Wu *et al.* gegenüber Hydrolyse ausreichend stabil ist.<sup>[46]</sup> Im direkten Vergleich der beiden Zyklisierungsmethoden wird ersichtlich, dass es einen großen Unterschied macht, ob die Zyklisierung entlang der Watson-Crick-Basenpaare oder entlang des Phosphatrückgrats erfolgt. Letztere Strategie führt im Falle einer Ringgröße von 21 Nukleotiden zu einer weniger starken Duplexdestabilisierung, welche ungefähr dem Ausmaß beim klassischen Einbau zweier photolabiler Schutzgruppen an den Nukleobasen entspricht. Für Anwendungen der Genregulation, bsp. mit Hilfe von RNA-Interferenz, spielen auch Wechselwirkungen zwischen dsRNA und dem RISC-Protein-Komplex über das Phosphatrückgrat eine Rolle. Es ist daher weiterhin interessant, den Nutzen der Phosphatzyklisierung für lichtgesteuerte Genregulation zu untersuchen.

#### **3.4.4 Darstellung einer zyklisierten, photoaktivierbaren AntimiR-34a**

Aufbauend auf den Ergebnissen sollte das Zyklisierungskonzept entlang des Phosphatrests nun erstmals auf eine funktionelle RNA übertragen werden. In einer Kollaboration zwischen der Arbeitsgruppe Alexander Heckel und der Arbeitsgruppe Stefanie Dimmeler steht die miR-34a im Fokus der Untersuchungen. Die miR-34a Expression wird transkriptionell durch das Tumorsuppressorprotein p53 reguliert.<sup>[54]</sup> p53 spielt eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung von „Antwort“-Mechanismen im Zuge von DNA-Schädigung in der Zelle. Eine hohe miRNA-34a Expression führt u.a. zu einer Inhibierung des anti-apoptotisch wirkenden Proteins Sirtuin 1 (SIRT1). Die miR-34a Expression ist in verschiedenen Tumorarten herunterreguliert, wodurch die eigentlich sinnvolle Apoptose der Tumorzellen unterdrückt wird. Ein therapeutisches miR-34a Mimik („MRX34“) befand sich seit 2013 in der klinischen Phase-1 Studie. Dimmeler *et al.* konnten in einer weiteren Studie zeigen, dass miR-34a auch einen direkten Einfluss auf den Alterungsprozess von Herzmuskelgewebe hat.<sup>[138]</sup> Dabei konnte am Maus-Modell gezeigt werden, dass das Absterben von Herzmuskelgewebe infolge eines Myokardinfarkts durch das hohe Expressionslevel von miR-34a gesteuert wird und durch Zugabe von Antisense-Oligonukleotiden vermindert werden kann. Eine systemische

Verwendung eines therapeutischen AntimiR-34a unterdrückt die Apoptose jedoch auch dort, wo sie erwünscht ist und würde damit nicht zuletzt die Entstehung von Tumorzellen fördern. Die lokale Wirksamkeit von Licht stellt daher eine Voraussetzung für die spezifische Regulation der miR-34a-Expression dar. Für die Anwendung photolabil geschützter AntimiR im Gewebe wurde bereits von Dr. Florian Schäfer in dessen Doktorarbeit darauf hingewiesen, dass die Absorptionswellenlängen der photolabilen Schutzgruppen ins therapeutische Fenster (ab ca. 600 nm) verschoben werden müssen. Den Schwerpunkt dieser Bemühungen bildet eine aktuell von M. Sc. Patricia Müller betriebene Forschungsarbeit im Arbeitskreis Heckel, bei der BODIPY- und Polymethincyanin-Derivate für photoaktivierbare zyklisierte AntimiR-34a entwickelt werden sollen.

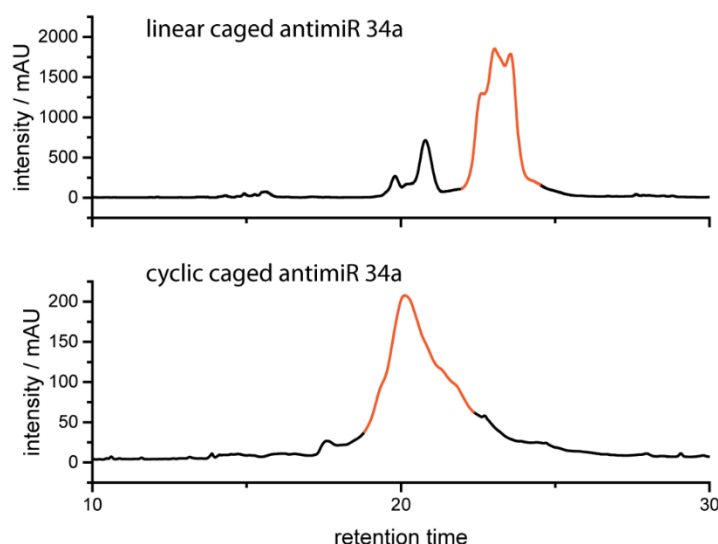


**Abb. 71** Übersicht der miR-34a-Struktur, sowie der AntimiR-34a und den photolabil geschützten linearen und zyklisierten Varianten

Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation war es nun zunächst das Ziel, die generelle Anwendbarkeit der Zyklisierungsstrategie auch für komplexere antisense-RNA-Oligonukleotide zu evaluieren. Das DEACBY-modifizierte dC-Phosphoramidit **102** und U-Phosphoramidit **104** wurden mittels Festphasensynthese an Position 5 bzw. 18 des caged AntimiR-34a (c-AntimiR-34a) angebracht, sodass nach Zyklisierung zum cyclic caged AntimiR-34a (cc-AntimiR-34a) ein großer Teil der seed-Region in einem relativ kleinen intrasequentiellen Zyklus eingebettet ist (Abbildung 71). Da auch die Phosphoramidite **102** und **104** bei der angestrebten Konzentration von 0,12 M Konzentration in Acetonitril nicht vollständig löslich waren, wurden insgesamt 10 Volumen-% DCM hinzugefügt. Die Kupplungseffizienz des dC-Phosphoramidits **102** lag trotz sperriger photolabiler Modifikation am Phosphorzentrum genauso hoch wie die verwendeten unmodifizierten Phosphoramidite. Das sterisch anspruchsvollere U-Phosphoramidit **104** dagegen wies eine leicht verringerte



Kupplungseffizienz von 87-93% auf. Zur Erhöhung der *in vivo*-Stabilität (Nukleaseresistenz) wurden sowohl für die AntimiR-34a Positivkontrolle, als auch für die caged-Varianten alle Phosphat-Gruppen mittels 3-Ethoxy-1,2,4-dithiazolin-5-on (EDITH-Reagenz) an Stelle der Iod-Oxidation innerhalb des Festphasensynthesezyklus in Phosphorthioat-Gruppen überführt. Aus demselben Grund wurden alle AntimiR-34a-Varianten mit 2'-Methoxygruppen synthetisiert, lediglich an Position 5 des c-AntimiR-34a und cc-AntimiR-34a wurde aufgrund der Verfügbarkeit ein photolabil und Alkin-modifizierte Desoxycytidin-Derivat verwendet.



**Abb. 72** RP-HPLC-Chromatogramme von caged AntimiR-34a (DMTrOff-Aufreinigung) vor und nach der CuAAC-Zyklisierung mit AMB-Bisazid-Linker **93**. Gesammelte Fraktionen sind farblich hervorgehoben.

Die Zyklisierung von c-AntimiR-34a wurde mit dem AMB-Bisazid-Linker **93** in einer CuAAC-Reaktion bei leicht erhöhten Temperaturen (35 °C) durchgeführt und dann zunächst nach Standardprotokoll (Vakuumentrifugation, Anlösen in TEAA-Puffer und Aufreinigung per RP-HPLC) aufgearbeitet. Dabei stellte sich erneut die Löslichkeit des Oligonukleotids als Problem heraus, denn im Zuge der RP-HPLC-Aufreinigung wurde kein Oligonukleotid detektiert. Auch das Anlösen des Eppendorf-Reaktionsgefäß-Rückstands mit verschiedenen Anteilen organischer Lösungsmittel (10% MeCN, 4% DMSO/tBuOH) zeigten nur Spuren von Oligonukleotiden in der RP-HPLC. Erst durch Schütteln mit 2 M TEAA-Puffer bei 75 °C für eine Stunde konnten schließlich 31% des Produktes cc-AntimiR-34a nach RP-HPLC-Aufreinigung isoliert werden (Abbildung 72). Vermutlich blieb ein Großteil des übrigen Oligonukleotids weiterhin als unlöslicher Rückstand zurück, weshalb in zukünftigen Synthesen die Vakuumentrifugation entweder nur bis kurz vor Trockene (Verhindern einer Salzbildung zwischen cc-AntimiR-34a und Puffer/Cu(I)-/Cu(II)-/TCEP-Spezies) erfolgen oder ganz durch Lyophilisation ersetzt werden sollte. Ein weiteres interessantes Resultat zeigte die massenspektrometrische Untersuchung des isolierten Produkts, welches mit einer Masse von

8134.4 Da zwar korrekt detektiert, vor allem aber als vielfaches Cu(I)-Addukt erhalten wurde. Ein solches Cu-Addukt wurde in keiner der vorangegangenen CuAAC-Zyklisierungsreaktionen beobachtet und könnte in den zahlreichen Phosphorthioat-Modifikationen begründet sein. Cu(I)-S-Bindungen sind im biologischen Kontext vor allem für Cystein-Wechselwirkungen bekannt, die auch zu polymeren Strukturen führen können.<sup>[139]</sup> Dies könnte ein Indiz für die überraschend geringe wässrige Löslichkeit des cc-AntimiR-34a nach Vakuumzentrifugation sein. In jedem Fall würden Cu(I)-Spezies *in vivo* ein Problem für die Zellviabilität bedeuten, weshalb das cc-AntimiR-34a schließlich mittels zweifacher Ethanol-fällung in 0,3 M Natriumacetatlösung ins Natriumsalz überführt wurde. Damit stand zum Ende der Dissertationsarbeiten ein photoaktivierbares, zyklisiertes AntimiR-34a für Zellkulturexperimente zur Verfügung, die im Rahmen der Forschung von M. Sc. Patricia Müller in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Stefanie Dimmeler weitergeführt werden.

### 3.4.5 Zusammenfassung und Ausblick

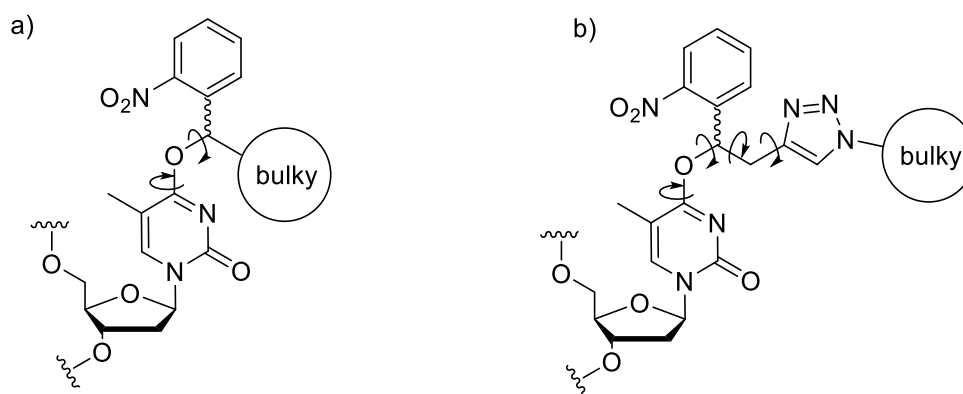
Aufbauend auf den Ergebnissen aus Kapitel 3.3.3 wurde in diesem Projektteil die Zyklisierung von Oligonukleotiden entlang des Phosphatrückgrats untersucht. Es ist dabei gelungen, eine einfache Syntheseroute für Phosphoramidit-Bausteine mit photolabil und Alkin-funktionalisierten Substituenten am Phosphorzentrum zu entwickeln. Damit wird der synthetische Aufwand zur Herstellung photolabil geschützter DNA- und RNA-Phosphoramiditbausteine auf einen einzigen Kupplungsschritt reduziert, sodass große Substanzmengen in kurzer Zeit beispielsweise für *in vivo*-Studien von Antisense-Oligonukleotiden zur Verfügung gestellt werden können. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Zyklisierung der 32-mer Modell-DNA (**ODN2**) entlang des Phosphatrückgrats analog zu den Beispielen entlang der Nukleobasen (Kapitel 3.3.3) mittels CuAAC-Reaktion funktioniert. Dabei wurden in den beiden untersuchten Beispielen jedoch etwas geringere Ausbeuten (25-44%) als in den Beispielen entlang der Nukleobasen nach Aufarbeitung erzielt. Eine Schmelzpunktbestimmung des Phosphat-zyklisierten 4-24 DEACBY p-**CON2** zeigte, dass die Schmelzpunktniedrigung weniger stark ausfällt als im Vergleich zur Zyklisierung entlang der Nukleobasen. Dies liegt zum einen in der Umpolung der Donor-Akzeptor-Eigenschaften an den modifizierten Thymidinen, aber vermutlich auch in der zusätzlichen Abschirmung durch den Linker entlang der benachbarten Basenpaare im Falle der Nukleobasen-Zyklisierung begründet. Um den destabilisierenden Einfluss der Phosphatzyklisierung im Vergleich zur Nukleobasenzyklisierung besser beurteilen zu können, wäre eine systematische Untersuchung unter Variation der Zyklisierungsparameter analog zur Durchführung in Kapitel 3.3.3.3 möglich. Auch wäre eine Strukturlösung mittels NMR-Spektroskopie sicherlich sehr interessant. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Wu *et al.* an Phosphat-geschützter siRNA konnte für 4-24 DEACBY p-**CON2** auch nach mehrfachen Aufheizen bis 80 °C nach insgesamt 16 Stunden keine Hydrolyse der photolabilen

Schutzgruppen festgestellt werden. Aus diesem Grund sollte die Phosphatzyklisierungsstrategie in zukünftigen Arbeiten einen schnellen Zugang u.a. zu photoaktivierbaren Antisense-Oligonukleotiden für *in vivo*-Anwendungen bieten. Ein Beispiel hierfür war in diesem Projektteil die Herstellung einer photoaktivierbaren, zyklisierten cc-AntimiR-34a, die in einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Stefanie Dimmeler zur Photoregulation der Apoptose in Herzmuskelgewebe eingesetzt werden soll. Eine cc-AntimiR-34a-Probe inklusive Positivkontrolle konnte erfolgreich hergestellt werden und steht nun für erste *in vivo*-Experimente zur Steuerung der miR-34a-Expression mit Licht zur Verfügung. Sollte sich dabei wie erhofft herausstellen, dass die zyklisierte cc-AntimiR-34a mit nur zwei photolabilen Modifikationen eine geringe Hintergrundaktivität vor Belichtung, jedoch volle Aktivität nach Belichtung zeigt, so wäre der Grundstein gelegt für die von M. Sc. Patricia Müller weitergeführten Bestrebungen, bathochrom-verschobene photolabile Schutzgruppen (BODIPY, Polymethincyanine) mit der Zyklisierungsstrategie zu verknüpfen und direkt am Maus-Modell zur Regulation der miR-34a einzusetzen.

### 3.5 Maximierung des Duplex-destabilisierenden Effekts einer einzelnen photolabilen Schutzgruppe mit Hilfe eines CuAAC-Screenings

#### 3.5.1 Einleitung

Die erste photolabile Schutzgruppe auf einer Nukleobase wurde 2004 von Heckel und Kröck publiziert.<sup>[140]</sup> Dabei wurde der Duplex-destabilisierende Effekt verschiedener Nitrobenzylgruppen dazu verwendet, die Transkription einer T7-RNA-Polymerase mit Licht zu steuern. Seither wurden zahlreiche neuentwickelte photolabile Schutzgruppenderivate zur Destabilisierung von DNA- und RNA-Strukturen verwendet. Um den destabilisierenden Effekt verschiedener photolabiler Schutzgruppen miteinander zu vergleichen, wird im Arbeitskreis Heckel mit einer sogenannten 15-mer DNA-Benchmark-Sequenz gearbeitet, die an zentraler Stelle mit der jeweiligen photolabilen Modifikation versehen ist. Schmelzpunktmessungen erlauben dann eine Aussage über das Ausmaß der Duplexdestabilisierung durch das Vorhandensein der jeweiligen photolabilen Schutzgruppe. Beim Vergleichen der verschiedenen photolabilen Schutzgruppen konnte beobachtet werden, dass die Schmelzpunktniedrigung (nativer Schmelzpunkt etwa 49-54 °C) durch Einbau einer einzelnen photolabilen Modifikation in die Benchmark-Sequenz **ODN1** eine Sättigung erreicht (bei etwa 38-39°C). Dies führt, wie in Kapitel 1.2.3 erörtert, dazu, dass in zahlreichen Anwendungen multiple photolabile Schutzgruppen entlang der Oligonukleotidsequenz eingebaut und dann mit einer hohen Bestrahlungsdosis wieder entfernt werden müssen. Eine Möglichkeit zur Verbesserung dieses Problems wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die intrasequentielle Zyklisierung von Oligonukleotiden mit einem Bisazid-Linker entwickelt. Ein alternativer Ansatz könnte es aber auch sein, den Duplex-destabilisierenden Effekt einer einzelnen photolabilen Schutzgruppe weiter zu erhöhen. In einer Kollaboration zwischen den Arbeitskreisen Prof. Dr. Harald Schwalbe und Prof. Dr. Alexander Heckel konnte an Hand eines NMR-Strukturmodells gezeigt werden, dass der Einbau einer photolabilen Schutzgruppe die Stabilität der Wasserstoffbrückenbindungen im Duplex erniedrigt und zu einer lokalen Verzerrung der Duplexstruktur führt.<sup>[141]</sup> Um diesen Effekt zu vergrößern, liegt es nahe, den sterischen Anspruch der photolabilen Schutzgruppe zu erhöhen. Eine besonders günstige Modifikationsstelle stellt dabei die  $\alpha$ -Position zur Schutzgruppe dar, da sich hier die sterische Modifikation in unmittelbarer Nähe zu den Nukleobasen befindet. Ein sterischer Rest kann auf verschiedene Weisen in  $\alpha$ -Position zur Schutzgruppe eingeführt werden. Eine direkte Verknüpfung garantiert eine geringe Flexibilität, sodass trotz Rotation der Substituenten eine signifikante Destabilisierung des Duplexes zu erwarten ist (Abbildung 73a). Jedoch steht hier im besten Fall bereits von Anfang an ein geeigneter sperriger Rest in Ausblick. Dieser muss nämlich früh auf Ebene der Schutzgruppen-Synthese angefügt werden, woraufhin eine Vielzahl von Synthesestufen bis hin zum photolabil geschützten Phosphoramidit und schließlich die Synthese des photolabil und sperrig modifizierten Oligonukleotids folgen.



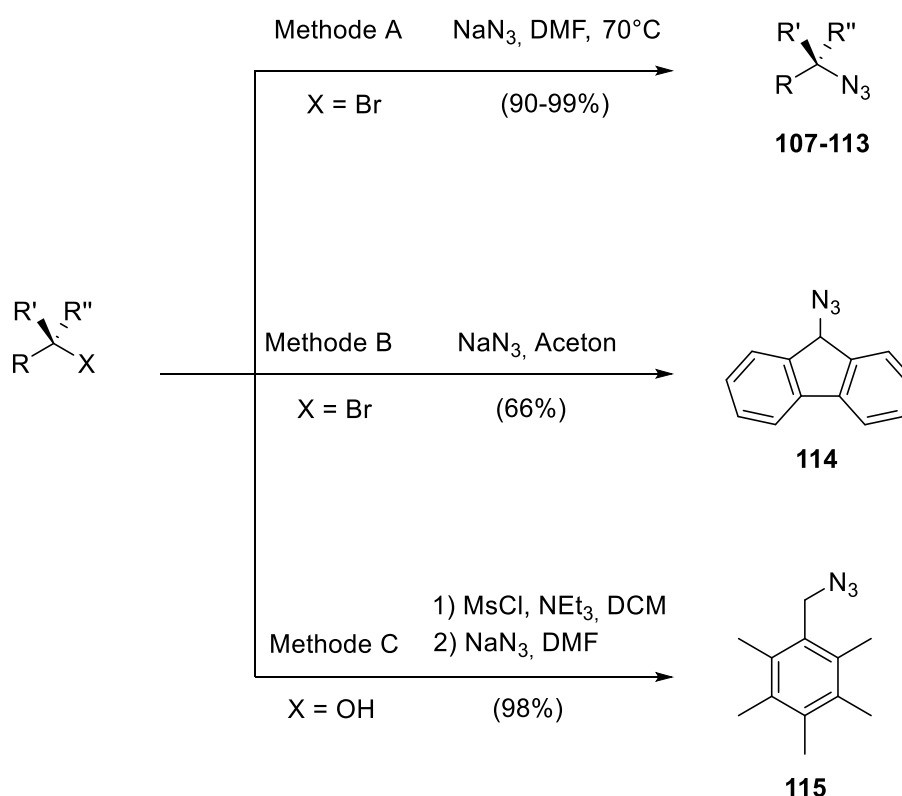
**Abb. 73** Design sterisch anspruchsvoller photolabiler Schutzgruppen zur Destabilisierung der Duplexstabilität über (a) eine direkte Verknüpfung des sterischen Substituenten in  $\alpha$ -Position oder über (b) einen sperrigen Triazolrest, welcher über eine CuAAC aus einem Propargyl-Rest in  $\alpha$ -Position erhalten wird.

Das Testen verschiedener sperriger Substituenten auf ihre Duplex-destabilisierenden Eigenschaften führte aus diesem Grund in Strategie a) zu einem enormen präparativen und zeitlichen Aufwand. Anders verhält es sich in Strategie b), bei der zunächst eine Alkin-modifizierte photolabile Schutzgruppe wie NPBY oder DEACBY als Vorläufer eingesetzt wird. Ein entsprechend modifiziertes Oligonukleotid kann nun in einem Schritt mit einer Vielzahl sperriger Azid-Substituenten zur Reaktion gebracht werden, sodass in kurzer Zeit eine Serie photolabil und Triazol-modifizierter Oligonukleotide auf ihre Duplex-destabilisierenden Eigenschaften untersucht werden können. Die hierfür benötigten Phosphoramidit-Vorläufer wurden praktischerweise im Rahmen der in den vorhergehenden Kapiteln diskutierten DNA-Zyklisierungsstudien bereits hergestellt (Kapitel 3.2-3.4). Während in Strategie a) aufgrund der geringen konformationellen Flexibilität theoretisch ein optimaler sterischer Rest identifiziert werden kann, eignet sich das CuAAC-Screening in Strategie b) zur schnellen Identifizierung eines trotz höherer konformationeller Freiheitsgrade optimierten sterischen Restes für die Destabilisierung von Oligonukleotid-Duplexen. Beide Strategien werden jedoch verfolgt, (b) im Rahmen der vorliegenden Dissertation und (a) im Rahmen der Dissertationen von Dean Klötzner, M. Sc. und György Pintér, M. Sc. und die Ergebnisse in Form einer gemeinsamen Publikation zusammengeführt. Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich mit der post-synthetischen CuAAC-Modifikation der DNA-Benchmark Sequenz mit verschiedenen sperrigen Azid-Resten und der Untersuchung dieser Reste auf ihren destabilisierenden Einfluss mittels Schmelzpunktbestimmung. Hierbei wird auch der Einfluss der absoluten Konfiguration berücksichtigt und zu diesem Zwecke eine enantioselektive Synthese der photolabilen Schutzgruppen-Derivate entwickelt. Für den in diesem Screening identifizierten optimalen sperrigen Substituenten wird eine photochemische Charakterisierung durchgeführt.

Darüber hinaus wird in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Gerhard Hummer basierend auf MD-Simulationen ein Modell für dessen destabilisierende Wechselwirkung mit dem DNA-Duplex der Benchmarksequenz entwickelt.

### 3.5.2 Synthese einer Bibliothek von Azid-Substituenten

Die Synthese der sperrigen Azid-Substituenten wurde nach drei verschiedenen Methoden durchgeführt (Abbildung 74). Die meisten Derivate waren durch simple nukleophile Substitution eines Brom-Vorläufers durch einen Natriumazidüberschuss in DMF mit sehr hohen Ausbeuten von 90-98% zugänglich (Tabelle 1).



**Abb. 74** Synthese der sperrigen Azid-Substituenten nach Standardmethode A (nukleophile Substitution am Brom-Vorläufer mit Natriumazid in DMF), Methode B für das Fluorenderivat **114** und Methode C über zwei Stufen für das Pentamethylbenzyl-Derivat **115**

Die Azid-Bibliothek besteht aus verschiedenen einfach zugänglichen Strukturmotiven: Azide **107-110** bestehen aus einem gewöhnlichen Benzylrest mit zunehmender aliphatischer Seitenkette (Abstandhalter), **111** stellt ein gewinkeltes Biphenyl-Derivat dar und **114** ist das verbrückte Fluoren-Analogon dazu. Azid **112** ist ein kondensierter Doppelaromat, **115** ein vollständig methylierter Benzylring und Derivat **113** schließlich ist ein räumlich sehr anspruchsvolles Dendrimer. Zusätzlich wurde ein kommerziell erhältliches Adamantyl-Azid eingesetzt.

**Tabelle 1.** Syntheseübersicht der verschiedenen Azid-Substituenten und deren Ausbeute

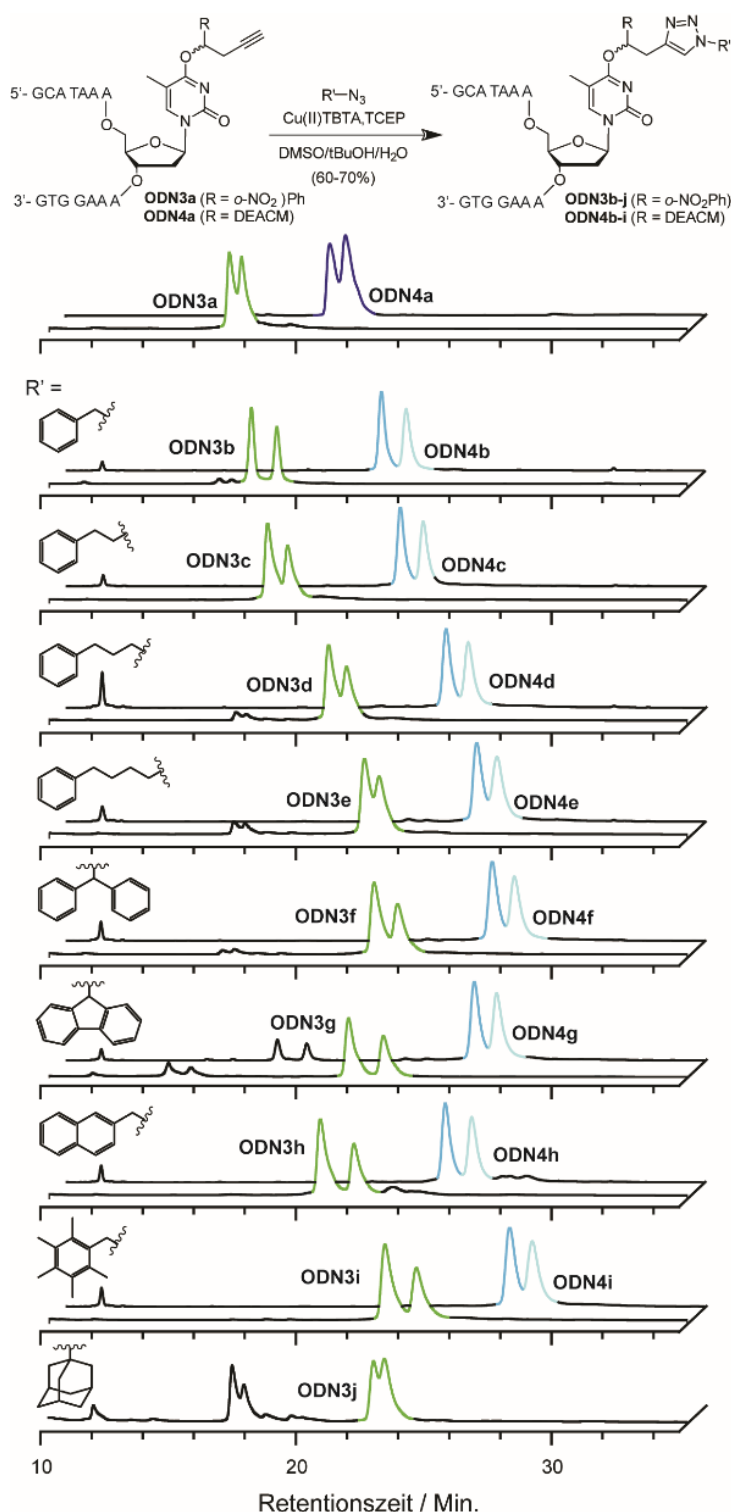
Eintrag	R =	R' =	R'' =	Methode	Ausbeute
<b>107</b>	Ph	H	H	A	50%
<b>108</b>	-CH <sub>2</sub> Ph	H	H	A	97%
<b>109</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Ph	H	H	A	98%
<b>110</b>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Ph	H	H	A	99%
<b>111</b>	Ph	Ph	H	A	90%
<b>114</b>	-9-Fluorenyl	R	H	B	66%
<b>112</b>	-2-Naphthalenyl	H	H	A	96%
<b>113</b>	(3,5-Bis[3,5- bis(benzyloxy)benzyloxy] benzyl)-	H	H	A	99%
<b>115</b>	C <sub>6</sub> H(CH <sub>3</sub> ) <sub>5</sub>	H	H	C	98%

Bei den Synthesen führte lediglich für das Fluoren-Derivat **114** die Standardmethode A nicht zum gewünschten Produkt. Stattdessen wurde der Brom-Vorläufer zum Keton oxidiert. Ein Wechsel des Lösungsmittels zu Aceton erlaubte eine Umsetzung mit einer Ausbeute von 66%. Im Falle des Pentamethylbenzylazids war der Alkohol-Vorläufer kommerziell erhältlich. Dieser wurde zunächst mittels Mesylchlorid in eine gute Abgangsgruppe umgewandelt und direkt durch nukleophile Substitution mit einem Natriumazid-Überschuss ins Produkt **115** überführt.

### 3.5.3 Post-synthetische CuAAC auf DNA mit sperrigen Azid-Substituenten

Unter Verwendung der Phosphoramidite **68** und **75** wurden mittels DNA-Festphasensynthese zunächst die NPB- bzw. DEACBY-geschützten Oligonucleotide **ODN3a** und **ODN4a** hergestellt (Abbildung 75), wobei das entsprechend photolabil geschützte Thymidin-Derivat an zentraler Stelle der 15-mer Benchmark-Sequenz eingebaut wurde. Die auf diese Weise erhaltenen photolabil geschützten Oligonucleotide besitzen eine Alkin-Funktionalität, die nun im Anschluss mit den verschiedenen sperrigen Azid-Resten **107-115** über eine CuAAC-Reaktion post-synthetisch modifiziert werden sollten. Die Reaktion wurde analog zu den Zyklisierungsreaktionen in den vorhergehenden Kapiteln mit Cu(II)TBTA und TCEP als Reduktionsmittel durchgeführt. Während bei der Zyklisierung die 1:1-Stöchiometrie zwischen Oligonucleotid und Bis-Azid ein kritischer Parameter ist, wurde in den folgenden CuAAC-Reaktionen mit einem 10-fachen Überschuss der Azid-Komponente gearbeitet. Ein Monitoring der Reaktionen mittels RP-HPLC zeigte nach 18 Stunden (in fast allen Fällen) vollständige Umsetzung an, wobei sowohl Startmaterial als auch Produkt als Diastereomergemisch, d.h. als Doppel-Peak im RP-HPLC-Spektrum beobachtet wurden. In allen Fällen führt das Anbringen eines sterisch anspruchsvollen Restes zu einer Verschiebung der Retention zu späteren Zeiten. Dies liegt an der stärkeren hydrophoben Wechselwirkung aller Produkt-Oligonucleotide durch die unpolaren Triazol-Substituenten. Die Ausbeuten nach Aufreinigung liegen für einen 5 nmol-Ansatz typischerweise zwischen 60 und 70% (Tabelle 2). Ein

Reaktionsansatz zur Synthese von **ODN3b** mit 20 nmol Startmaterial-DNA lieferte eine besonders hohe Ausbeute nach Aufreinigung von 91%, welche eher im Einklang mit dem vollständigen Verbrauchs des Startmaterials in den RP-HPLC-Chromatogramme steht.



**Abb. 75** Reaktionsschema der post-synthetischen CuAAC zwischen Benchmark-DNA und verschiedenen sperrigen Azid-Substituenten. Dargestellt sind darüber hinaus die RP-HPLC-Chromatogramme der Reaktionsgemische nach 18 Stunden Reaktionszeit für die NPBY-geschützten Oligonukleotide **ODN3a-j** (grün) und die DEACBY-geschützten Oligonukleotide **ODN4a-j** (blau)



Sowohl für die NPBY-, als auch für die DEACBY-Derivate wird eine vergleichsweise niedrige isolierte Ausbeute bei der Reaktion mit Biphenylazid **111** und dem Fluorenylazid **114** erhalten. Die entsprechenden DNA-Derivate lassen sich offensichtlich schlechter aus dem Rückstand der CuAAC-Reaktion lösen. Einzig für die Fluorenyl-Triazol-Oligonukleotide **ODN3g** und **ODN4g** werden darüber hinaus DNA-Nebenprodukte nach CuAAC-Reaktion beobachtet. Diese wurden nicht näher charakterisiert, tragen aber aufgrund der Diastereomerenauftrennung und der typischen UV/Vis-Absorptionsspektren nach wie vor die photolabile Schutzgruppe und entsprechen aber von der Retentionszeit her nicht dem Startmaterial. Das kommerzielle Adamantyl-Azid ging unter den Standardbedingungen keinerlei CuAAC-Reaktion mit der DNA ein. Als einziger Vertreter mit tertiärem Azid liegt dies vermutlich an einer zu großen sterischen Repulsion. Es wurde aus diesem Grund eine alternative Reaktionsdurchführung unter Zuhilfenahme von Mikrowellenstrahlung (bei 60 °C) erprobt, die tatsächlich nach einer Stunde Reaktionszeit ungefähr halbe Konversion des Startmaterials **ODN3a** im RP-HPLC-Monitoring und eine isolierte Ausbeute des Produkts **ODN3j** von 24% ergab. Unter denselben Bedingungen ergab sich jedoch leider keine Reaktion für das sterisch sehr anspruchsvolle und damit interessante Dendrimer-Azid **113**.

**Tabelle 2.** Ausbeuten der post-synthetischen CuAAC-Reaktionen sowie ESI-MS-Daten

sperrige DNA	Ausbeute	berechnete Masse [Da]	gemessen [Da]
<b>ODN3b</b>	91%*	4953.0	4953.8
<b>ODN3c</b>	68%	4967.0	4967.7
<b>ODN3d</b>	62%	4981.0	4981.4
<b>ODN3e</b>	62%	4995.0	4995.7
<b>ODN3f</b>	33%	5029.0	5029.8
<b>ODN3g</b>	21%	5027.0	5027.7
<b>ODN3h</b>	66%	5003.0	5003.7
<b>ODN3i</b>	73%	5023.0	5023.7
<b>ODN3j</b>	24%	4997.0	4997.7
<b>ODN4b</b>	59%	5047.1	5046.7
<b>ODN4c</b>	66%	5061.1	5060.8
<b>ODN4d</b>	61%	5075.1	5074.8
<b>ODN4e</b>	64%	5089.1	5088.8
<b>ODN4f</b>	45%	5123.1	5122.7
<b>ODN4g</b>	49%	5121.1	5120.7
<b>ODN4h</b>	68%	5097.1	5096.7
<b>ODN4i</b>	63%	5117.1	5116.8

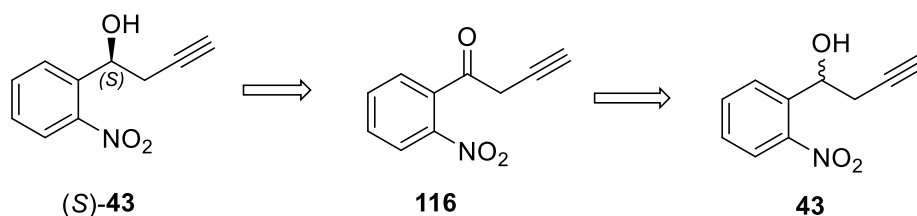
\*Umsetzung von 20 nmol anstatt 5 nmol Startmaterial

### 3.5.4 Zuordnung der absoluten Konfigurationen im Click-Screen

Wie in den RP-HPLC-Chromatogrammen in Abbildung 75 ersichtlich, werden die sperrig substituierten photolabil geschützten Oligonukleotide als Diastereomeregemische isoliert. Insbesondere im Falle der DEACBY-Derivate ist es jedoch gelungen, die Diastereomere getrennt voneinander zu isolieren und hinsichtlich Duplexdestabilisierung und photochemischen Eigenschaften zu charakterisieren. Wie bereits in einer Studie von Steinert und Schäfer in Kollaboration zwischen den Arbeitsgruppen Prof. Dr. Harald Schwalbe und Prof. Dr. Alexander Heckel festgestellt wurde, hat die absolute Konfiguration einen signifikanten Einfluss auf die Duplex-destabilisierenden Eigenschaften.<sup>[141]</sup> In dieser Studie stellte sich dabei das (S)-konfigurierte NPE-Derivat auf einem Cytidin-Baustein als die destabilisierendere Konfiguration heraus. Eine der großen Fragen in dem vorliegenden Projektteil war es daher, ob sich diese Beobachtung der vorangegangenen Studie zu einer allgemein gültigen Regel formulieren lässt. Für die hierfür benötigte Zuordnung der absoluten Konfigurationen in den DNA-Derivaten **ODN3** und **ODN4** musste als erstes ein photolabiler Schutzgruppen-Vorläufer mit definierter absoluter Konfiguration hergestellt und zu einem geeigneten Phosphoramidit-Baustein umgesetzt werden. Hiermit befasst sich der folgende Abschnitt.

#### 3.5.4.1 Enantioselektive Synthese der NPBY- und DEACBY-Schutzgruppen

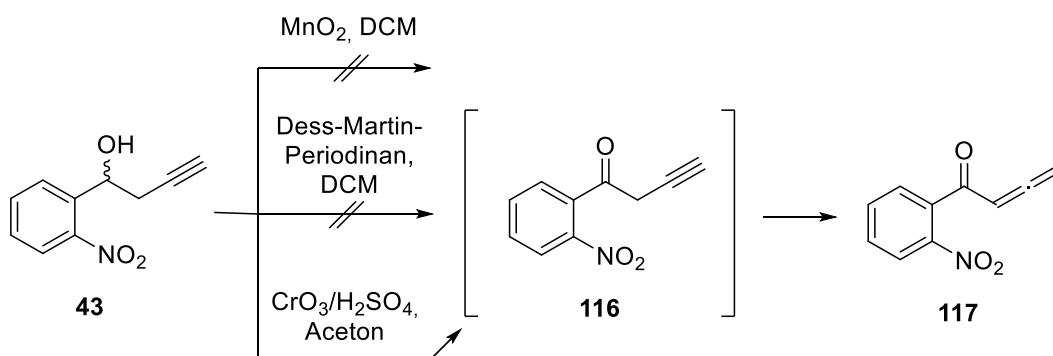
Die erste Syntheseroute zur enantioselektiven Darstellung der NPBY- und DEACBY-Alkohol-Derivate **43** bzw. **56** beinhaltet als Schlüsselschritt eine enantioselektive Reduktion eines Keton-Vorläufers **116** (Abbildung 76). Ein Beispiel für eine solche Reduktion ist die COREY-BAKSHI-SHIBATA-REDUKTION (CBS-Reduktion), bei der ein Prolin-basiertes chirales Auxiliar zusammen mit Boran als Reduktionsmittel eingesetzt wird. Das Keton wiederum kann durch Oxidation des racemischen Alkohol-Derivats der photolabilen Schutzgruppe erhalten werden.



**Abb. 76** Retrosynthetische Überlegung zur enantioselektiven Darstellung der NPBY-Schutzgruppe **43**

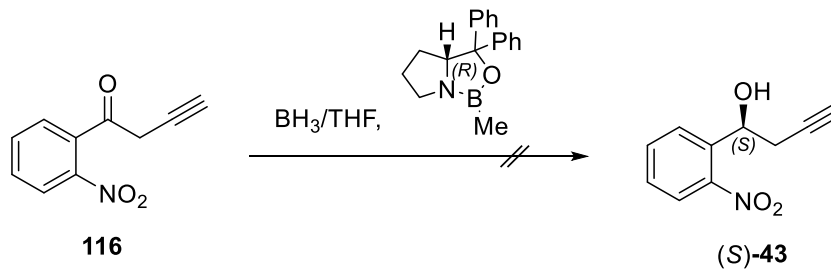
Oxidationsreaktionen in benzylicher Position sind in der Literatur gut beschrieben. Eine milde Möglichkeit ist die Oxidation von **43** mit Manganoxid in DCM, bei der jedoch keine Reaktion eintrat (Abbildung 77). Unter DESS-MARTIN-Oxidationsbedingungen zeichnete sich ebenfalls nach mehreren Tagen keine klare Produktbildung ab (Reaktionskontrolle über Dünnschichtchromatographie). Es wurde daher beschlossen, die Oxidation unter den

harschen Bedingungen einer JONES-OXIDATION durchzuführen. Hierzu wurde NPBY-Alkohol **43** mit Chrom(VI)-Oxid in Schwefelsäure und Aceton zur Reaktion gebracht. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte eine Produktfraktion isoliert werden. Eine  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopische Untersuchung zeigte ein charakteristisches Triplett bei 6.19 ppm und ein Dublett bei 5.05 ppm, die eine  $J$ -Kopplung von 6,4 Hz aufweisen. Ein solches Spektrum kann nicht über das Alkin **116** erhalten werden, sondern ist typisch für Allen-Derivate wie Verbindung **117**. Wie in der Literatur ausführlich diskutiert, ist das Keton **116** in  $\alpha$ -Position CH-azide und geht sowohl unter basischen, als auch unter leicht sauren Bedingungen rasch eine Tautomerisierung ins Allen **117** ein. Die Reaktion wurde für Derivat **116** bereits in der Literatur von Hashmi *et al.* gezeigt, bemerkenswert ist hierbei, dass die Tautomerisierung bereits durch das Kieselgel im Zuge der säulenchromatographischen Aufreinigung initiiert wird.<sup>[142]</sup> Tatsächlich weisen sowohl das Reaktionsprodukt **117**, als auch das Edukt **43** in der Dünnschichtchromatographie in den verwendeten Lösungsmittelgemischen eine nahezu identische Retention auf, sodass vermutlich bereits unter DESS-MARTIN-Bedingung das Allen **117** gebildet, aber nicht erkannt werden konnte.



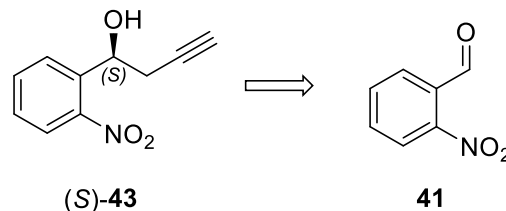
**Abb. 77** Oxidation des NPBY-Alkohols **43** zum Keton unter verschiedenen Bedingungen. Das Keton **116** tautomerisiert rasch zum Allen **117**.

Nichtsdestotrotz wurde entsprechend der Literatur davon ausgegangen, dass Verbindung **116** während der Reaktion als Alkin vorliegt. Aus diesem Grund wurde schließlich versucht, das Keton **116** ohne säulenchromatographische Aufreinigung direkt nach wässriger Aufreinigung weiter im Sinne einer CBS-Reduktion umzusetzen (Abbildung 78). Mittels analytischer Dünnschichtchromatographie konnte jedoch keine Umsetzung zum Produkt (Referenzverbindung **43**) beobachtet werden. Der Syntheseweg über eine enantioselektive Reduktion wurde aus diesem Grund verworfen.



**Abb. 78** CBS-Reduktion von Keton **116** mit (*R*)-(+)-2-Methyl-CBS-oxazaborolidin

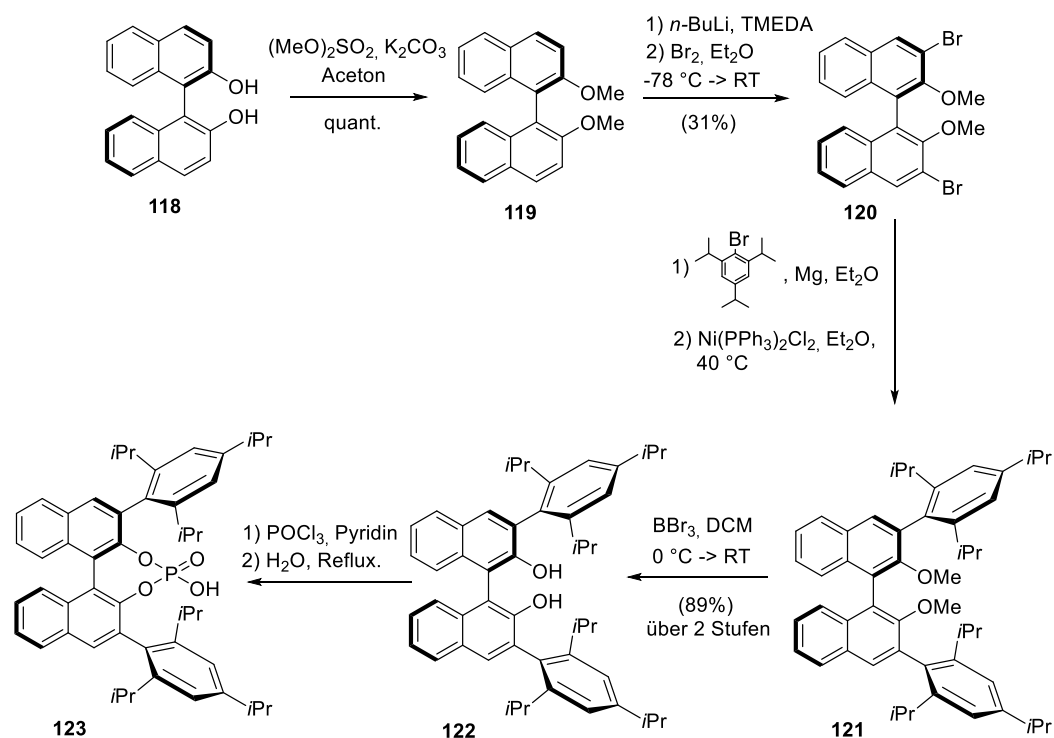
Eine weitere denkbare Syntheseroute zur enantioselektiven Darstellung der NPBY- und DEACBY-Schutzgruppen-Alkohole geht vom Aldehyd-Vorläufer aus (Abbildung 79). Der Schlüsselschritt bei dieser Reaktion ist eine asymmetrische Propargylierung.



**Abb. 79** Retrosynthetische Überlegung zur enantioselektiven Darstellung des DEACBY-Alkohols (*S*)-**43** über eine asymmetrische Propargylierungsreaktion.

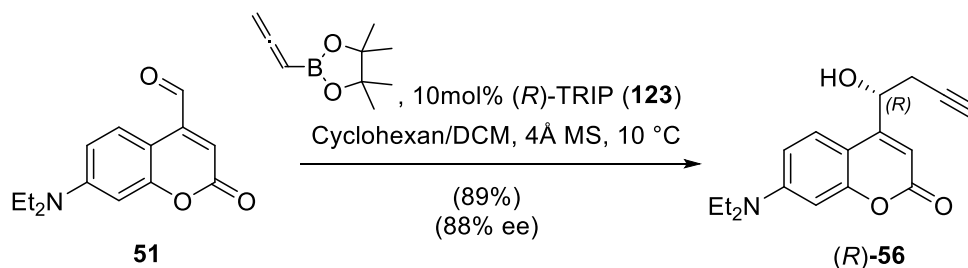
Asymmetrische Propargylierungen von Aldehyden sind in der Literatur zahlreich publiziert. Eine elegante Methode wurde kürzlich in zwei unabhängigen Arbeiten von Reddy<sup>[143]</sup> bzw. Jain *et al.*<sup>[144]</sup> veröffentlicht, bei der die chirale Brønsted-Phosphorsäure (*R*)-/(*S*)-3,3'-Bis(2,4,6-triisopropylphenyl)-1,1'-binaphthyl-2,2'-diylhydrogenphosphat (TRIP) als enantioselektiver Katalysator verwendet wird. (*R*)-TRIP **123** wurde ausgehend von (*R*)-BINOL **118** in Zusammenarbeit mit Dominik Göbel, M. Sc. über fünf Stufen nach einer abgewandelten Literaturvorschrift dargestellt (Abbildung 80).<sup>[145]</sup>

Die Abwandlung betrifft hierbei die erste Stufe der Reaktion, bei der als Methylierungsmittel Dimethylsulfat anstelle von Methyljodid eingesetzt wurde. Der quantitativen Umsetzung zu Methylether **119** folgte eine *ortho*-Lithiierung mit anschließendem Lithium-Brom-Austausch bei einer Ausbeute von 31%. Das bromierte BINOL **120** wurde daraufhin in einer Nickel-katalysierten Kumada-Kupplung mit den sperrigen Triisopropyl-Substituenten gekuppelt. Ohne weitere Aufreinigung wurde Verbindung **121** direkt mit Bortribromid von den Methylgruppen befreit, wobei die Ausbeute über zwei Stufen bei 89% lag. Im letzten Schritt wurde Verbindung **122** mit Phosphorylchlorid versetzt, nach wässriger Hydrolyse und Protonierung mit Salzsäure wurde schließlich (*R*)-TRIP **123** erhalten.



**Abb. 80** Synthese des chiralen Brønstedsäure-Katalysators (*R*)-TRIP **123**<sup>[145]</sup>

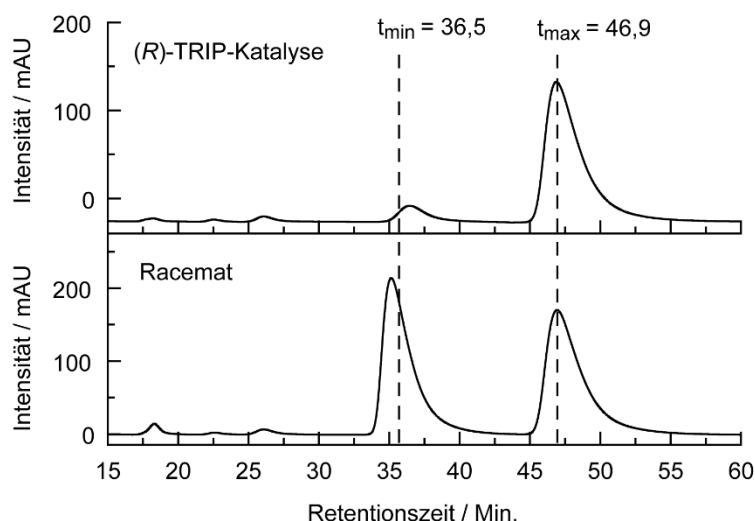
Erste Versuche der Umsetzung von 2-Nitrobenzaldehyd (**41**) mit Allenylborsäurepinakolester unter Verwendung von 20 mol% (*R*)-TRIP und 4 Å Molsieb wurden nach dem Protokoll von Jain *et al.* in Toluol bei -20 °C durchgeführt.<sup>[144]</sup> Das Edukt **41** weist bei diesen Bedingungen jedoch eine nur äußerst geringe Löslichkeit auf, weswegen kaum Produkt gebildet wurde. Produkt, welches mittels präparativer Dünnschichtchromatographie isoliert wurde, zeigte keine enantioselektive Reaktion an. Auch der Cumarin-Aldehyd **51** wies eine zu geringe Löslichkeit in Toluol auf, weswegen fortan mit den Reaktionsbedingungen nach Reddy in Cyclohexan bei Raumtemperatur gearbeitet wurde.<sup>[143]</sup>



**Abb. 81** Enantioselektive Synthese von DEACBY-Alkohol (*R*)-56 mit Hilfe des chiralen Brønstedsäure-Katalysators (*R*)-TRIP **123**

In reinem Cyclohexan sollte gemäß den Ergebnissen von Reddy die größte Enantioselektivität erreicht werden, jedoch befindet sich nur ein kleiner Teil des Startmaterials **51** während der

Reaktion in Lösung. DEACBY-Alkohol ist in diesem Fall nur in Spuren entstanden, wurde aber per präparativer Dünnschichtchromatographie isoliert und über chirale HPLC analysiert. Dabei zeigte sich ein Enantiomerenüberschuss von 84% ( $t_{\min}$ : 36,5 Minuten, 8%;  $t_{\max}$ : 46,9 Minuten, 92%, siehe Abbildung 82). Um eine vollständige Reaktion zu erreichen, wurde der Aldehyd **51** daraufhin in einem 4:1 Gemisch aus Cyclohexan/DCM vollständig gelöst und die Reaktion mit 4 Å Molsieb und 6 mol% (*R*)-TRIP bei Raumtemperatur wiederholt. Dabei konnte 89% Ausbeute erzielt werden, allerdings mit einem niedrigeren Enantiomerenüberschuss von 75% ee. Eine nahezu quantitative Umsetzung mit 88% ee wurde schließlich durch Erniedrigen der Temperatur auf 10 °C und Erhöhen der Katalysatormenge auf 10 mol% erreicht (Abbildung 81). Die Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse aller Reaktionen wurde mittels HPLC mit einer OJ-R Chiralcel-Säule durchgeführt (Abbildung 82).

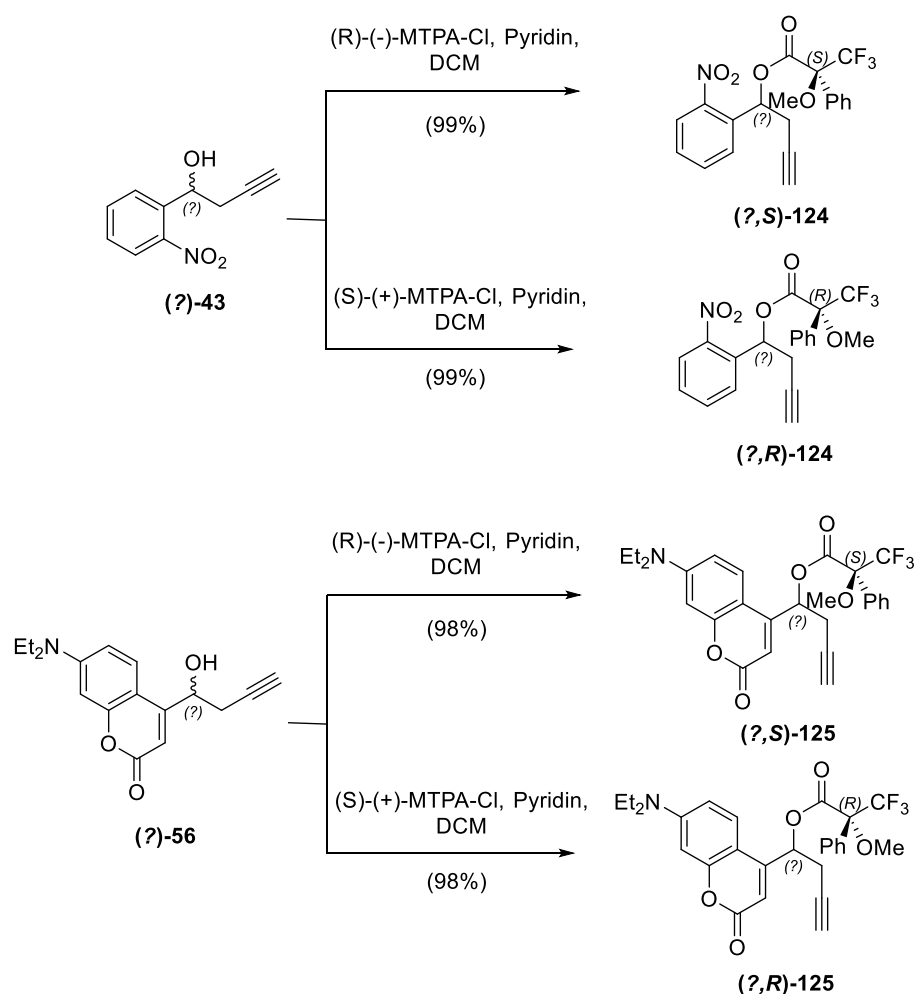


**Abb. 82** Exemplarisches HPLC-Spektrum (OJ-R Chiralcel) zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses nach (*R*)-TRIP-katalysierter Propargylierung von Cumarin-Aldehyd **51**

### 3.5.4.2 Mosher-Ester-Analysen und Röntgenkristallstruktur-Analysen

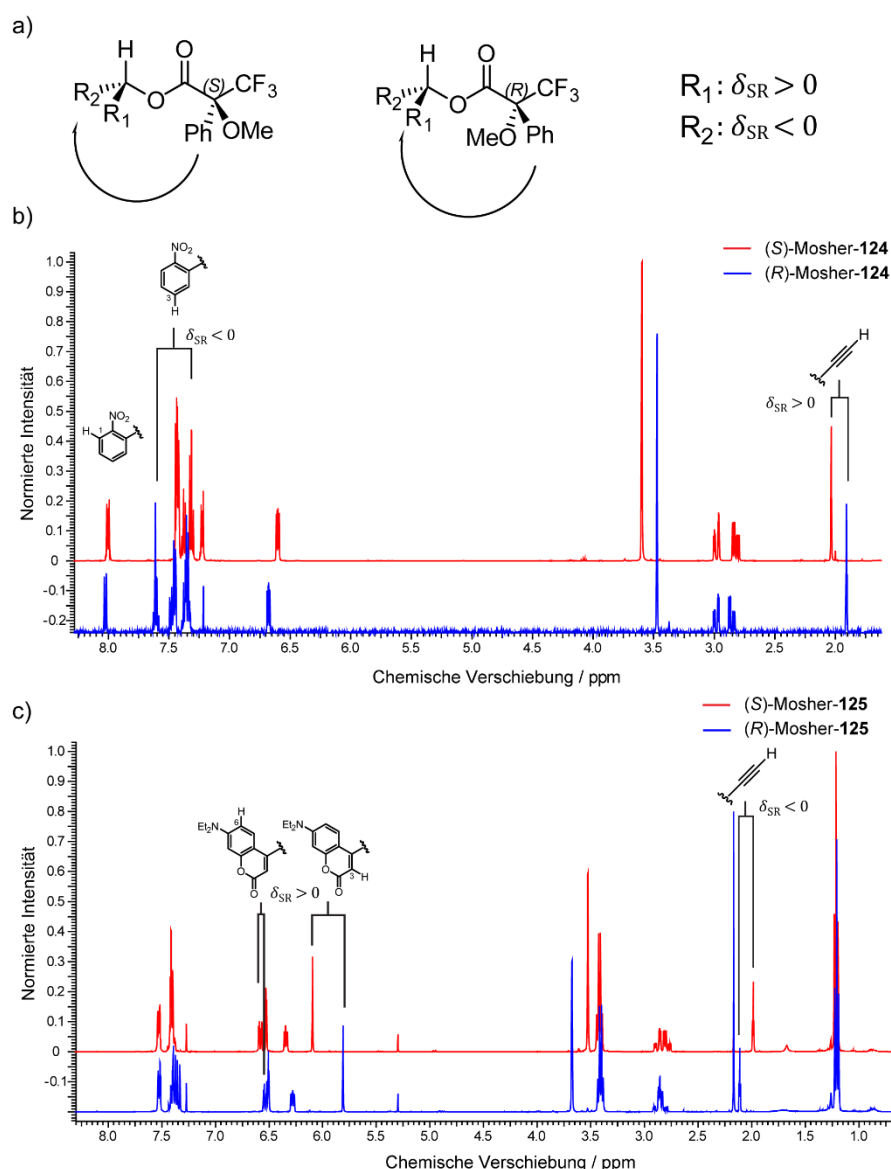
Der (*R*)-TRIP-Katalysator sollte gemäß Literatur selektiv zu einem (*R*)-konfigurierten Alkohol-Derivat führen. Dabei ist nicht automatisch davon auszugehen, dass die Vorhersage nach dem Wechselwirkungsmodell des TRIP-Katalysators auch für das komplexere DEACBY-Derivat **56** greift. Es war daher zunächst das Ziel, den einzelnen Peaks der chiralen HPLC-Spektren sowohl für die NPBY, als auch für die DEACBY-Alkohole eine absolute Konfiguration zuzuordnen. Hierzu wurde in erster Linie eine Mosher-Ester-Analyse durchgeführt. Um größere Materialmengen der reinen Enantiomere für die Mosher-Ester-Analyse zu erhalten, wurden zunächst über präparative chirale HPLC (Chiralcel IA) jeweils ca. 1 mmol der NPBY- bzw. der DEACBY-Alkohol-Enantiomere voneinander getrennt. Dabei wurde ein optimiertes isokratisches Laufmittelgemisch verwendet, welches maximale Löslichkeit bei noch

ausreichender Auftrennung der Enantiomerenpeaks gewährleistete (Hexan/Ethanol 80:20 für NPBY-Alkohol **43**, 75:25 für DEACBY-Alkohol **56**).



**Abb. 83** Der jeweils erste eluierte Peak der racemischen Verbindungen **43** und **56** aus der chiralen HPLC wurde mittels (*R*- und (*S*)-Mosher-Säurechlorid zu insgesamt vier Mosher-Ester-Diastereomeren umgesetzt.

Die Mosher-Ester Analytik zur Bestimmung der absoluten Konfigurationen wurde nach einem Protokoll von Hoyer *et al.* durchgeführt.<sup>[146]</sup> Jeweils das früher eluierte Enantiomer der beiden Schutzgruppen-Alkohole **43** bzw. **56** wurde hierzu sowohl mit einem (*R*-, als auch mit einem (*S*)-Mosher-Säurechlorid zu den vier Ester-Derivaten **124** und **125** (Abbildung 83) umgesetzt. Die Ausbeuten der Reaktionen waren in allen Fällen nahezu quantitativ. Anschließend wurden die Mosher-Ester mit <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie analysiert. Die Mosher-Ester-Analyse basiert auf einem empirischen Modell, nach dem der Ester jene Konformation bevorzugt einnimmt, in welcher Ester-, CF<sub>3</sub>-Gruppe und das Methin-Proton eine Ebene bilden.

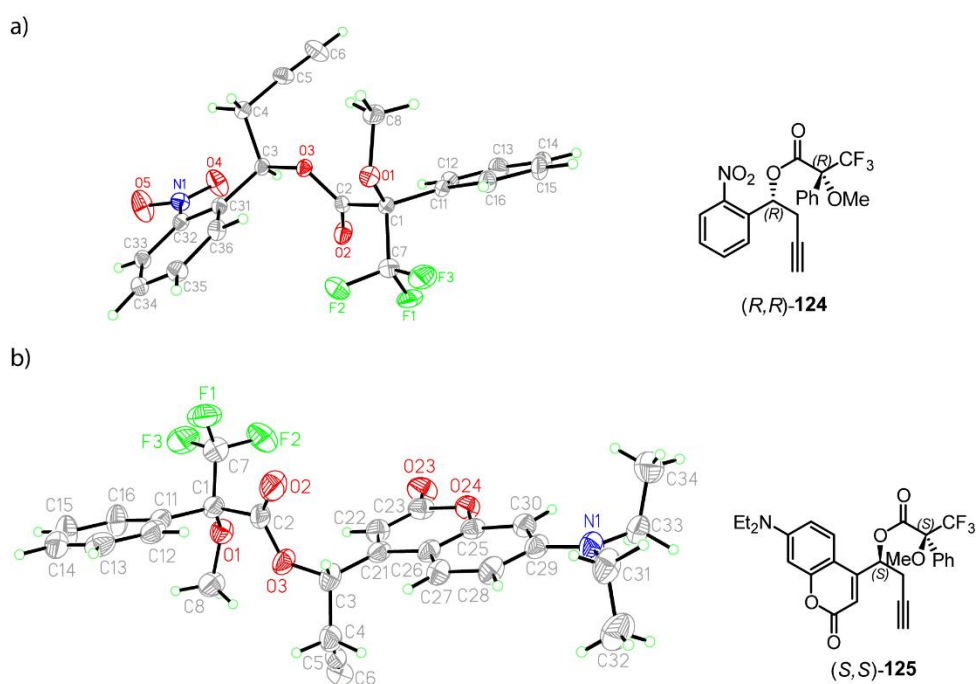


**Abb. 84** (a) Allgemeines Prinzip der Mosher-Ester-Analyse zur Bestimmung der absoluten Konfiguration chiraler Zentren. Protonen am Rest  $R_1$  erhalten bei Subtraktion der chemischen Verschiebungen  $\delta_{SR} = \delta_S - \delta_R$  ein positives, Protonen am Rest  $R_2$  ein negatives Vorzeichen. (b)  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des NPB- (S)- und des (R)-Mosher-Esters **124** ergeben ein (R)-konfiguriertes NPB-Zentrum. (c)  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des DEACBY-(S)- und des (R)-Mosher-Esters **125** ergeben ein (S)-konfiguriertes DEACBY-Zentrum.

Jene Substituenten am unbestimmten chiralen Zentrum, die auf derselben Seite wie die Phenylgruppe des Mosher-Restes liegen, erfahren durch den Ringstrom des Phenylsubstituenten eine Hochfeldverschiebung (Abbildung 84a). Durch Vergleich der chemischen Verschiebung  $\delta$  relevanter Protonen an den Resten  $R_1$  und  $R_2$  der (R)- und (S)-Mosherderivate ( $\delta_{SR} = \delta_S - \delta_R$ ) lässt sich über das Vorzeichen von  $\delta_{SR}$  auf die absolute Konfiguration des unbekanntes chiralen Zentrums schließen. Die für die Auswertung relevanten Protonensignale befinden sich zum einen am Propargyl-Substituenten und zum anderen am Nitrobenzyl- bzw. Cumarin-Substituenten. Dabei wurden nur die Signale mit signifikanter Verschiebungsdifferenz  $\delta_{SR}$  berücksichtigt. Für den früh eluierten NPB-Alkohol



besitzt  $\delta_{SR}$  der Nitrobenzylprotonen (H-1, H-3 sind signifikant) ein negatives,  $\delta_{SR}$  des terminalen Alkin-Protons ein positives Vorzeichen (Abbildung 84 b). Dies entspricht einem (*R*)-konfigurierten chiralen Zentrum, sodass der früh eluierte NPBY-Alkohol dem Enantiomer (*R*)-**43** zugeordnet werden kann. Im Falle des früh eluierten DEACBY-Alkohols besitzt  $\delta_{SR}$  für die Cumarin-Signale (H-3, H-6 sind signifikant) ein positives,  $\delta_{SR}$  des terminalen Alkin-Protons ein negatives Vorzeichen (Abbildung 84 c). Damit lässt sich der früh eluierte DEACBY-Alkohol dem Enantiomer (*S*)-**56** zuordnen. Offensichtlich werden die Enantiomere der NPBY- und DEACBY-Alkohole auf der Chiralcel IA-HPLC-Säule in entgegengesetzter Reihenfolge eluiert. Die Mosher-Ester-Analyse ist, wenn auch empirisch, ein legitimes Verfahren zur Bestimmung absoluter Konfigurationen von Alkohol- und Amino-Derivaten. Bei der Synthese der NPBY-Mosher-Ester **124** wurde das (*R*)-Mosher-Ester-Diastereomer (*R*)-**124** in Form gut kristallisierender weißer Nadeln erhalten. Zum Testen geeigneter Kristallisationsbedingungen wurden diese Nadeln in wenig Ethanol gelöst und dann bei Raumtemperatur, 4 °C und -20 °C offen gelagert. Sowohl bei Raumtemperatur, als auch bei 4 °C wurden Kristalle erhalten, die für eine Röntgenkristallstrukturanalyse verwendet werden konnten (Abbildung 85). Unter denselben Bedingungen konnten auch für das DEACBY-Mosher-Diastereomer (*S*)-**125** gelbfarbene Kristalle erhalten und für eine Röntgenkristallstrukturanalyse verwendet werden.

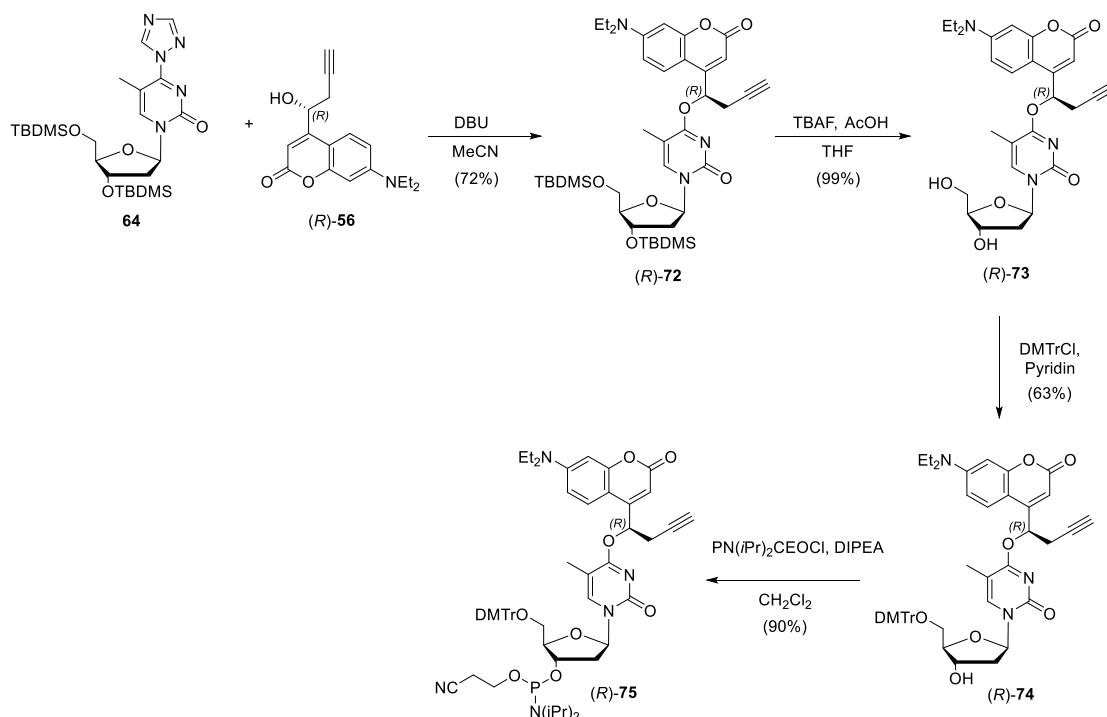


**Abb. 85** (a) Kristallstruktur und Strukturformel des Mosher-Ester-Diastereomers (*R,R*)-**124**. (b) Kristallstruktur und Strukturformel des Mosher-Ester-Diastereomers (*S,S*)-**125**. Die Kristallstrukturen bestätigen die Ergebnisse der Mosher-Ester-Analysen.

Da in den Mosher-Ester-Diastereomeren die absolute Konfiguration am Mosher-Zentrum bekannt ist, konnte die relative und somit die absolute Konfiguration am chiralen Zentrum der Schutzgruppen ermittelt werden. Diese entsprechen den Ergebnissen der Mosher-Ester-Analyse. Da die absolute Konfiguration somit den Peaks in der chiralen HPLC zugeordnet werden konnte, konnte weiterhin über HPLC-Vergleichsexperimente die absolute Konfiguration des Reaktionsprodukts der enantioselektiven Synthese von DEACBY-Alkohol 56 bestimmt werden. Im Einklang mit der Vorhersage laut Literatur ergibt die Katalyse mit (*R*)-TRIP das (*R*)-konfigurierte Produkt (*R*)-56.

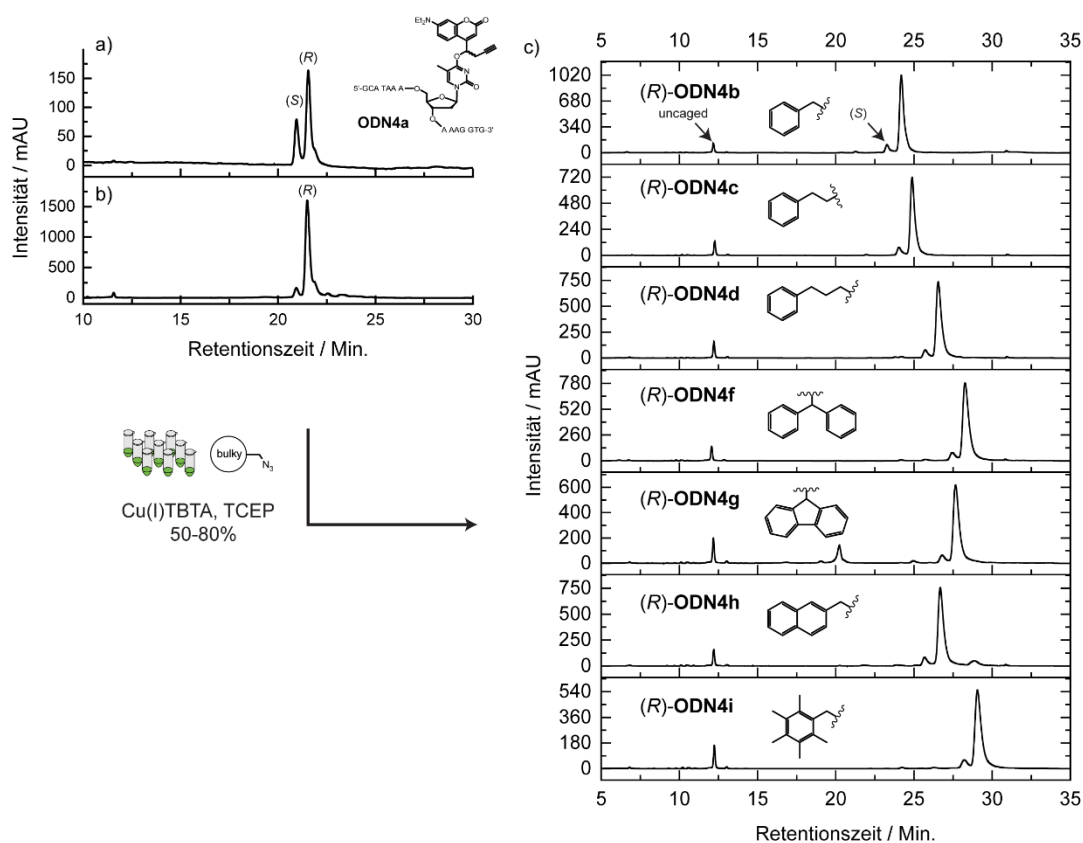
### 3.5.4.3 Synthese des diastereomerenreinen dT<sup>(R)</sup>-DEACBY-Phosphoramidits zur Zuordnung der absoluten Konfigurationen im Click-Screening

Für die Zuordnung der absoluten Konfigurationen zu den Diastereomeren-Peaks im „Click-Screening“ wurde ein Referenzoligonukleotid mit bekannter absoluter Konfiguration an der photolabilen Schutzgruppe benötigt. Im Rahmen der Bachelorarbeit von Johanna Ehrler, B. Sc. wurde der DEACBY-Alkohol (*R*)-56 analog zur Synthese des Diastereomergemisches in Kapitel 3.2.3 an einen Thymidin-Baustein geknüpft, der über drei weitere Stufen mit einer Gesamtausbeute von 40% zum diastereomerenreinen Phosphoramidit-Baustein (*R*)-75 umgesetzt wurde (Abbildung 86).



**Abb. 86** Syntheseroute zur Darstellung des diastereomerenreinen DEACBY-geschützten Thymidin-Phosphoramidits (*R*)-75

Das Phosphoramidit (*R*)-75 wurde daraufhin für die Herstellung eines diastereomerenreinen DEACBY-modifizierten Benchmark-Oligonukleotids (*R*)-ODN4a verwendet.

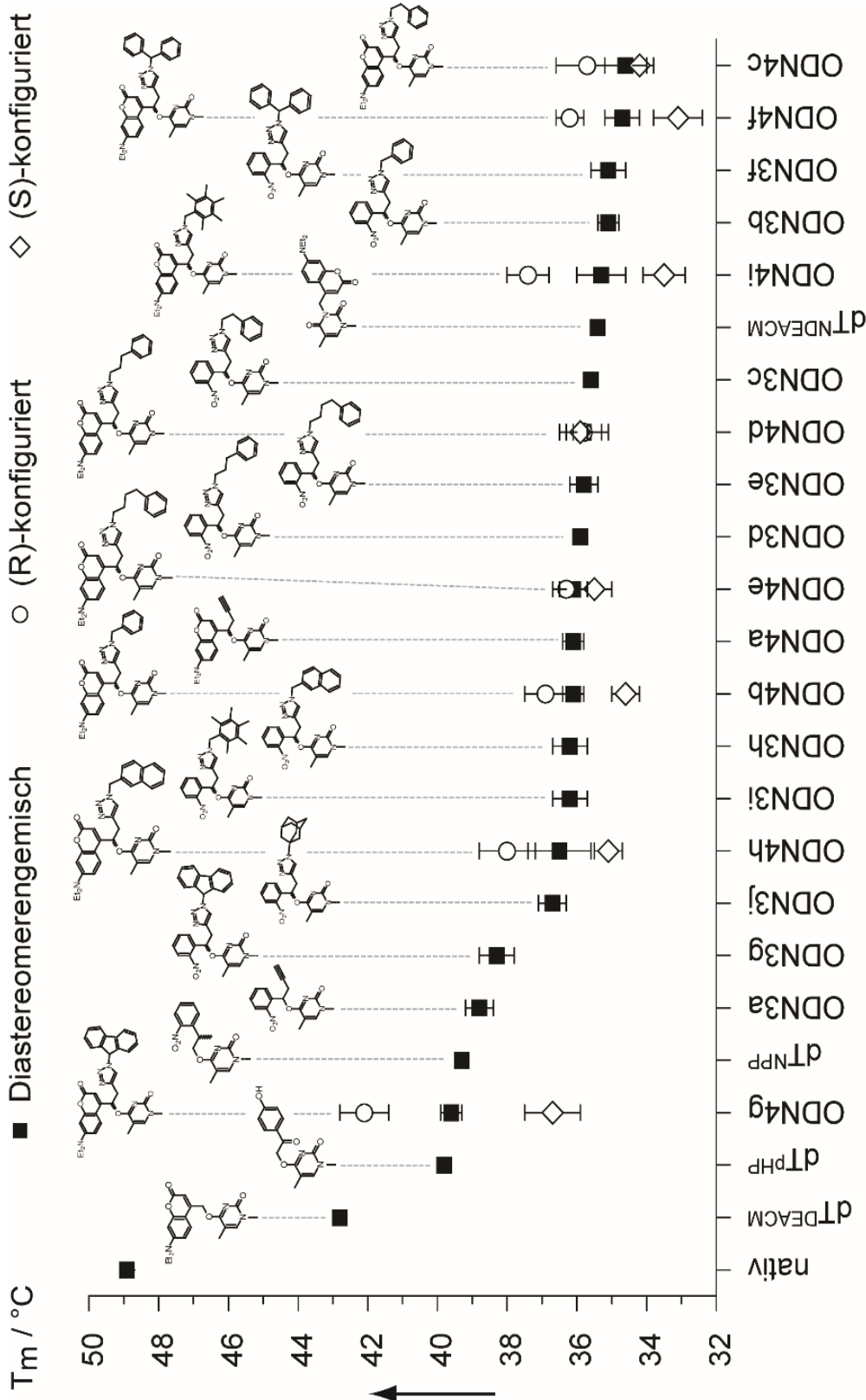


**Abb. 87** (a) RP-HPLC-Spektrum einer 1:1-Koinjektion von **ODN4a** (Diastereomergemisch) mit dem (fast) diastereomerenreinen (*R*)-**ODN4a** (b) RP-HPLC-Chromatogramm des (fast) diastereomerenreinen (*R*)-**ODN4a** als Referenz. Das Diastereomergemisch setzt sich entsprechend aus einem früh eluierten (*S*)-konfigurierten und später eluierten (*R*)-konfigurierten **ODN4a** zusammen. (c) RP-HPLC-Chromatogramme nach der CuAAC-Reaktion von (*R*)-**ODN4a** mit verschiedenen sperrigen Azid-Resten („Click-Screen“). In allen Fällen entspricht die später eluierte Fraktion der (*R*)-Konfiguration, (*S*)-Konfiguration, sowie das Photolyseprodukt **ODN1** werden als geringfügige Verunreinigungen beobachtet.

Im RP-HPLC-Spektrum wurde (*R*)-**ODN4a** als Hauptpeak mit einer kleinen Vorfraktion erhalten (Abbildung 87b). In einem Koinjektionsexperiment wurde das (fast) diastereomerenreine (*R*)-**ODN4a** im Verhältnis 1:1 mit dem Diastereomergemisch **ODN4a** über RP-HPLC analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass der spätere der beiden Diastereomeren-Peaks der (*R*)-, die früher eluierte Spezies der (*S*)-Konfiguration an der DEACBY-Schutzgruppe entspricht (Abbildung 87a). Die Probe (*R*)-**ODN4a** wurde daraufhin mittels CuAAC-Reaktion mit verschiedenen sperrigen Azid-Resten aus der Azid-Bibliothek modifiziert und das so erhaltene „Click-Screening“ erneut mittels RP-HPLC analysiert. Auch nach der CuAAC-Reaktion bleibt die früher eluierte Spezies (*S*)-, die später eluierte Spezies (*R*)-konfiguriert.

### 3.5.5 Einfluss der sperrigen Triazol-Substituenten auf die Duplexstabilität photoaktivierbarer DNA

Mit Hilfe einer postsynthetischen CuAAC-Reaktion wurde die Benchmark-Sequenz (**DNA1**) mit verschiedenen sperrigen Triazol-Nitrobenzyl und Triazol-Cumarinyl-Schutzgruppen versehen. Im Folgenden sollte der Einfluss dieser sperrigen Modifikationen auf die Stabilität der DNA-Duplexe untersucht werden. Hierzu wurde mittels temperaturabhängiger UV/Vis-Absorptionsspektroskopie der Schmelzpunkt der jeweiligen Oligonukleotide in 1x PBS-Puffer bestimmt. Die Ergebnisse dieser Schmelzpunktstudien sind in Abbildung 88 zusammengefasst. Der native DNA-Duplex ds**DNA1** weist einen Schmelzpunkt von 48,9 °C auf. Der Einbau der NPBY-Schutzgruppe (**ODN3a**) führt zu einer Schmelzpunkterniedrigung auf 38,8 °C, was einem  $\Delta T_m$  von knapp 10 °C entspricht. Der Schmelzpunkt liegt dabei in derselben Größenordnung, wie für andere Schutzgruppen (z.B. 39,8 °C für p-Hydroxyphenacyl (pHP)- und 39,3 °C 2-(o-Nitrophenyl)propyl) (NPP)-geschütztes Thymidin) vorangegangener Studien beobachtet wurde.<sup>[147,148]</sup> Die postsynthetische CuAAC mit verschiedenen Azid-Substituenten führt im NPBY-Screening **ODN3b-j** in allen Fällen zu einer weiteren Erniedrigung der Schmelzpunkte von bis zu 3,7 °C und damit zu einer zusätzlichen Duplexdestabilisierung. Der niedrigste Schmelzpunkt von 35,1 °C wird im Falle des Benzyltriazolsubstituenten (**ODN3b**) und des Diphenylmethyltriazolsubstituenten (**ODN3f**) gemessen. Entgegen der anfänglichen Erwartung erwies sich der zusätzliche destabilisierende Effekt durch den vermeintlich sperrigen Adamantyltriazol-Rest (**ODN3j**) mit 36,7°C als vergleichsweise gering. Auch überraschend ist die Tatsache, dass der Fluorenyltriazol-Rest (**ODN3g**) mit 38,3 °C kaum eine zusätzliche Duplexdestabilisierung bewirkt. Zusammengefasst bewirken die Triazol-Substitutionen an der NPBY-Struktur eine zusätzliche Duplexdestabilisierung zwischen 0,5 und 3,7 °C. Im Vergleich zum NPBY-Derivat resultiert der Einbau der DEACBY-Schutzgruppe (**ODN4a**) mit einem Schmelzpunkt von 37,6 °C in einer etwas stärkeren Duplexdestabilisierung. Dies kann mit dem erhöhten sterischen Anspruch der DEACBY-Schutzgruppe erklärt werden. Auch im Falle des DEACBY-Screenings führt die postsynthetische Kupplung sperriger Azid-Substituenten zu einer zusätzlichen Schmelzpunkterniedrigung bis zu einem Minimalwert von 34,6 °C für das Phenylethyltriazol-Derivat (**ODN4c**). Dieser Wert ist 0,5 °C niedriger als das Minimum im NPBY-Screening. Auffällig ist auch hier wieder der Fluorenyltriazol-Rest (**ODN4g**), welcher mit einem Schmelzpunkt von 39,6 °C sogar um 2 °C höher ausfällt als vor der CuAAC-Modifizierung. Hier liegt die Vermutung nahe, dass das fast planare Fluoren (in zumindest einer der möglichen absoluten Konfigurationen) eine stabilisierende Wechselwirkung mit den Basenpaarstapelungen eingehen kann.



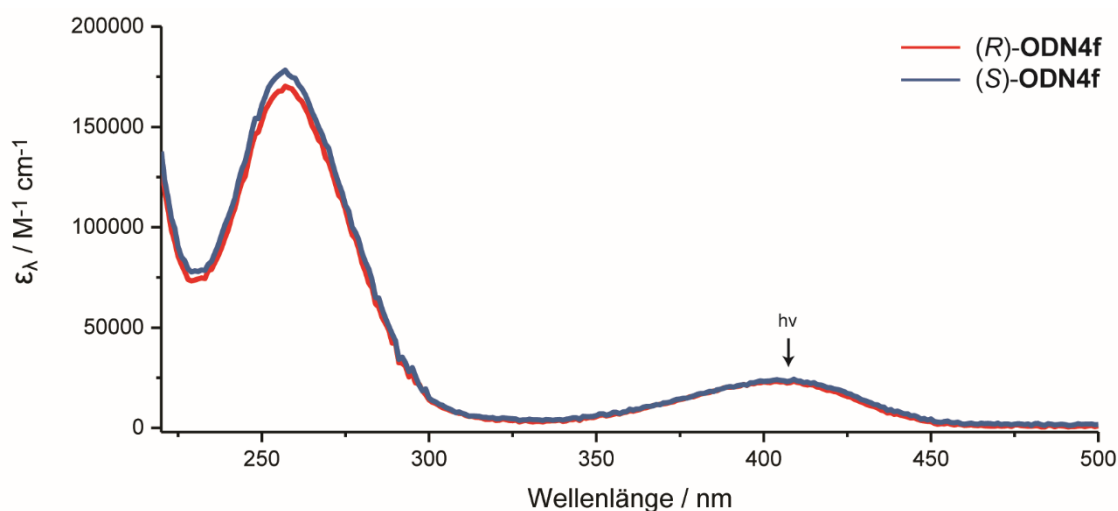
Duplexstabilität

**Abb. 88** Schmelzpunktstudien der photolabil geschützten Benchmark-Sequenzen **ODN3a-j** und **ODN4a-i** vor und nach der post-synthetischen CuAAC mit sperrigen Azid-Resten. Die verschiedenen Modifikationen sind nach abnehmender Duplexstabilität der Diastereomergemische angeordnet. Für die DEACBY-Triazol-Derivate **ODN4a-i** wurden die (R)- und (S)-konfigurierten Diastereomere auch getrennt analysiert. Zum Vergleich sind ebenfalls die Schmelzpunkte von Benchmark-DNA mit Thymidin-DEACM, -pHP, -NPP, sowie -NDEACM-Schutzgruppen aufgeführt.

Das nicht-planare Diphenyl-Analogon (**ODN4f**) dagegen benötigt aufgrund der Rotationsfreiheitsgrade der Phenylreste deutlich mehr Platz und besitzt mit einem Schmelzpunkt von 34,7 °C zusammen mit Phenylethyltriazol-Derivat (**ODN4c**) die niedrigsten Schmelzpunkte der gesamten Messreihe. Beide Motive befinden sich sowohl im NPBY-, als auch im DEACBY-Screening im Bereich der niedrigsten Schmelzpunkte. Für die spektroskopisch vorteilhafteren DEACBY-Derivate wurde außerdem der Einfluss der absoluten Konfiguration an der photolabilen Schutzgruppe untersucht. Die erste große Schlussfolgerung aus den Studien ist, dass in allen Fällen das in der RP-HPLC früher eluierte (*S*)-Diastereomer die niedrigeren Schmelzpunkte ergibt. Dieses Ergebnis bestätigt damit den Befund der Studie von Steinert und Schäfer, nach welcher das (*S*)-konfigurierte NPE auf einem Desoxycytidinbaustein deutlich stärker destabilisierend wirkt als die entsprechende (*R*)-Konfiguration.<sup>[141]</sup> Die Differenz der Schmelzpunkte zwischen (*R*)- und (*S*)-Konfiguration beträgt hierbei bis zu 5,4 °C im Falle des Fluorentriazol-Derivats (**ODN4g**). Das zweite wichtige Ergebnis aus dieser Studie ist, dass der sperrige Rest mit der stärksten Duplexdestabilisierung (*S*)-konfiguriertes Diphenylmethyltriazolylcumarin ((*S*)-DPMTC) darstellt. Der Schmelzpunkt dieses Substitutionsmusters weist mit einem Wert von 33,1 °C eine außerordentlich große Schmelzpunkterniedrigung von insgesamt  $\Delta T_m = 15,8$  °C auf. Der niedrigste Schmelzpunkt (35,4 °C) für die Benchmark-DNA mit Thymidin-Modifikation wurde zuvor durch Einbau der achiralen DEACM-Schutzgruppe an N<sup>3</sup>-Position der Nukleobase (dT<sup>NDEACM</sup> in Abbildung 87) erreicht. Allerdings ist NDEACM keine geeignete photolabile Schutzgruppe, da hier eine C-N-Bindung durch Licht gespalten werden müsste, was bekannterweise für DEACM-Derivate nicht funktioniert. (*S*)-DPMTC ist somit nach aktuellem Stand die photolabile Schutzgruppe, mit dem größten Duplex-destabilisierenden Effekt bei einfachem Einbau in die Oligonukleotidsequenz.

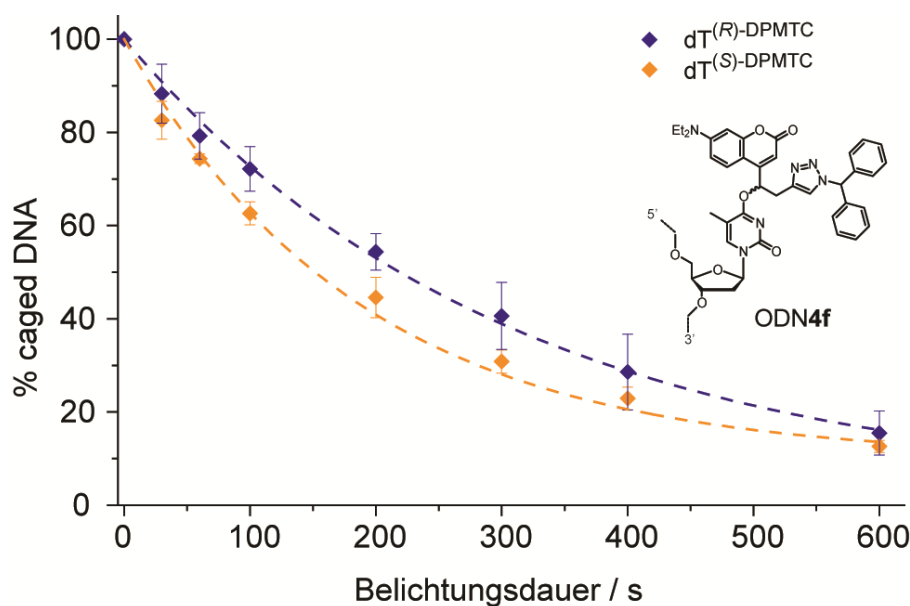
### 3.5.6 Photochemische Charakterisierung der DPMTTC-Schutzgruppe

Nachdem über die Schmelzpunktstudien mit der sperrigen DPMTTC-Schutzgruppe ein vielversprechender neuer Kandidat für eine photolabile Oligonukleotid-Schutzgruppe identifiziert wurde, wurde diese anschließend auf ihre photochemischen Eigenschaften untersucht.



**Abb. 89** Auftragung des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{\lambda}$  gegen die Wellenlänge für die DPMTTC-geschützten Benchmark-Oligonukleotide (*R*)-**ODN4f** und (*S*)-**ODN4f**. Die Absorptionsmessung erfolgte in 1x PBS-Puffer mit einer Proben-Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  bzw. 20  $\mu\text{M}$  ( $\lambda \geq 300 \text{ nm}$ ) bei 1 cm Schichtdicke.

Das Absorptionsmaximum der Cumarin-Schutzgruppen liegt für beide DNA-Diastereomere identisch bei 409 nm mit einem molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{405\text{nm}} = 23400$  für das (*R*)-, 24300  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  für das (*S*)-Diastereomer. Die Bestimmung der Quantenausbeute und der Photolyseeffizienz wurde mit einer Thorlabs-LED bei 405 nm durchgeführt. Wie in Kapitel 3.3.3.4 erläutert, wurde hierzu zunächst eine Ferrioxalat-Aktinometrie durchgeführt und anschließend eine Probe der DPMTTC-geschützten Benchmark-DNA **ODN4f** für unterschiedliche Dauern belichtet. Mittels RP-HPLC wurde der Anteil photolyzierter DNA quantifiziert. In Abbildung 90 ist die Photolyse der photolabil geschützten DNA als Funktion der Belichtungsdauer aufgetragen. Bereits aus den exponentiellen Fits der Photolysekurven heraus ist ersichtlich, dass das (*S*)-konfigurierte DPMTTC-Diastereomer bei identischen Bedingungen eine schnellere Photolyserate aufweist, als das (*R*)-Diastereomer. In Quantenausbeute ausgedrückt bedeutet dies einen Wert von  $\phi = 0,007$  für das (*R*)- und  $\phi = 0,011$  für das (*S*)-Diastereomer. Weiterhin ergeben sich die Photolyseeffizienzen zu  $\epsilon(405 \text{ nm}) \cdot \phi = 170 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  für das (*R*)- und  $258 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  für das (*S*)-Diastereomer.



**Abb. 90** Photolyse der DPMTC-geschützten Benchmark-Oligonukleotide (**ODN4f**) in (*S*)- und (*R*)-Konfiguration (Belichtung mit einer Thorlabs LED bei 405 nm, 47 mW, 16,9  $\mu$ M in 1x PBS-Puffer, 13  $\mu$ l-Küvette). Die Photolyse des Startmaterials wurde mit einer Kinetik 1. Ordnung gefittet.

Mit diesem Ergebnis weist die (*S*)-konfigurierte DPMTC-Schutzgruppe nicht nur eine deutlich ausgeprägtere Duplexdestabilisierung auf, sondern besitzt vorteilhafterweise auch eine ca. 1,5-fach größere Photolyseeffizienz als das entsprechende (*R*)-Diastereomer, wobei der Wert für die Photolyseeffizienz in derselben Größenordnung wie vormals für die achirale DEACM-Schutzgruppe auf dT ( $\epsilon(405 \text{ nm}) \cdot \Phi = 247 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) publiziert wurde.<sup>[148]</sup> Generell ist es nicht verwunderlich, dass sich die Photolyseeffizienzen zwischen (*R*)- und (*S*)-Konfiguration unterscheiden, da die photolabile Schutzgruppe in den beiden Konfigurationen unterschiedlich mit der lokalen DNA-Doppelhelix-Struktur bzw. mit dem Lösungsmittel wechselwirken kann (Solvatation des Kontaktionspaars im Photolysemechanismus). Wie in Kapitel 3.3.3.4 bereits gezeigt (vgl. Abbildung 57), weist auch die Phenyltriazol-substituierte NPBY-Schutzgruppe (hier **ODN3b**) für beide Diastereomere eine unterschiedliche Photolyserate auf. Hierbei zeigt das früher eluierte Diastereomer, was auf Grundlage der Resultate des DEACBY-Screenings vermutlich ebenfalls dem (*S*)-Diastereomer entspricht, eine ca. 1,4-fach schnellere Freisetzung der nativen DNA.

### 3.5.7 Untersuchung photolabil geschützter DNA mit Molekulardynamik-Simulationen

Vergleicht man die Schmelzpunkte der verschiedenen sperrigen Schutzgruppen-Derivate, dann fällt auf, dass ein Plateaubereich erreicht wird, bei dem es im Rahmen des Fehlers nicht signifikant davon abhängt, welcher Substituent am Triazol angefügt wurde. Um eine genauere Vorstellung davon zu bekommen, wie die photolabilen, sperrig modifizierten Schutzgruppen auf molekularer Ebene mit dem DNA-Duplex wechselwirken, wurden im weiteren Verlauf der Studie in Zusammenarbeit mit Dr. Lukas Stelzl und Marcel Heinz, M. Sc. aus der Arbeitsgruppe



Prof. Dr. Gerhard Hummer Molekulardynamik-Simulationen (MD-Simulationen) durchgeführt. In MD-Simulationen werden Moleküle bzw. Atome als klassische Teilchen betrachtet, die gegenseitig Kraft aufeinander ausüben. Für die wirkenden Kräfte gilt einerseits das 2. Newtonsche Gesetz

$$F_i = m_i \cdot \ddot{r}_i \quad (17)$$

andererseits entspricht die Kraft der Ableitung der potentiellen Energie nach dem Weg

$$F_i = -\frac{\partial V(r)}{\partial r_i} = -\nabla V(r) \quad (18)$$

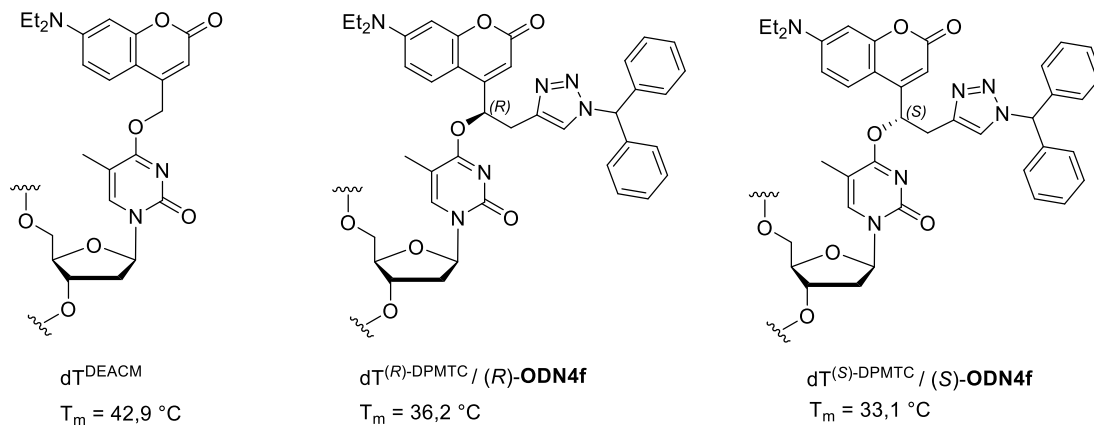
Die potentielle Energie  $V(r)$  wird über das Kraftfeld (bsp. AMBER, CHARMM, OPLS, usw.) beschrieben und setzt sich aus folgenden Energietermen zusammen:

$$V = \sum \overbrace{K_r (r - r_{eq})^2}^{\text{Bindungen}} + \sum \overbrace{K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2}^{\text{Bindungswinkel}} + \sum \overbrace{\frac{T_n}{2} [1 + \cos(n\varphi - \gamma)]}^{\text{Diederwinkel}} + \sum \overbrace{\left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right]}^{\text{Lennard-Jones}} + \underbrace{\frac{\widetilde{q_i q_j}}{\varepsilon R_{ij}}}_{\text{Coulomb}} \quad (19)$$

mit den Kraftkonstanten  $K_r$ ,  $K_\theta$ ,  $T_n$ , der Gleichgewichtsbindungslänge  $r_{eq}$ , dem Gleichgewichtsbindunswinkel  $\theta_{eq}$ , Anzahl Energiemaxima  $n$  und Winkel des ersten Energiemaximums  $\gamma$ , den Lennard-Jones-Parametern  $A_{ij}$ ,  $B_{ij}$ , sowie den Partiaalladungen  $q_i$ ,  $q_j$  den Atomabständen  $R_{ij}$  und der Dielektrizitätskonstante  $\varepsilon$ .

Im Zuge einer MD-Simulation werden aus der potentiellen Energie gemäß Gleichung (18) zunächst die wirkenden Kräfte zum Zeitpunkt  $t_0$  berechnet, mit Hilfe von Gleichung (17) die Bewegungsgleichungen gelöst und die neuen Atomkoordinaten zum Zeitpunkt  $t_0 + dt$  bestimmt. Diese Abfolge wird für eine Gesamtsimulationsdauer wiederholt, sodass sich schließlich eine sogenannte Simulationstrajektorie ergibt. Aus dieser lassen sich dann Informationen beispielsweise über Atomabstände und -winkel, sowie daraus abgeleitete Größen wie die Anzahl stabiler Wasserstoffbrückenbindungen und Basenstapelungen in DNA gewinnen.

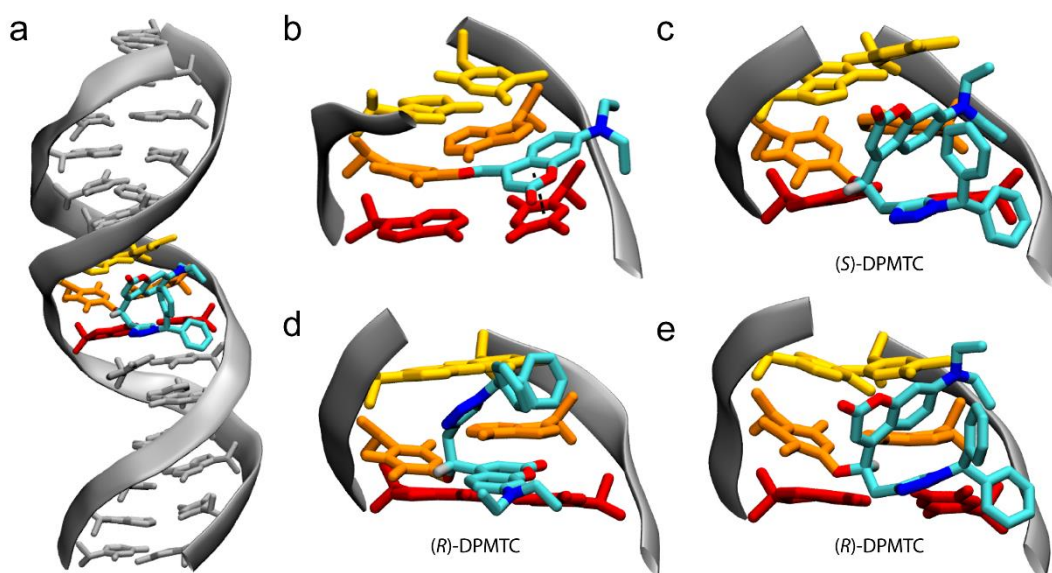
Die meisten Parameter in Gleichung (19) sind über die Wahl des Kraftfelds bereits festgelegt und basieren beispielsweise auf experimentellen Daten (Kristallstrukturen, NMR-Strukturen, IR-Spektroskopie, usw.) oder quantenmechanischen Berechnungen. Photolabile Schutzgruppen auf Nucleobasen müssen jedoch zunächst parametrisiert und in das Kraftfeld integriert werden.



**Abb. 91** Übersicht der photolabilen Schutzgruppen, die mittels MD-Simulation in dsDNA (Benchmarksequenz) untersucht wurden.

Hierzu wurden von Marcel Heinz, M. Sc. zunächst quantenmechanische *ab initio* Berechnungen an DEACBY- und NPBY- geschützten Thymidin-Bausteinen durchgeführt und die daraus erhaltenen Parameter in das AMBER-Kraftfeld integriert. Für die folgenden MD-Simulationen wurde außerdem die sogenannte BSC1-Modifikation implementiert, mit der in DNA-Simulationen eine bessere Beschreibung des  $\alpha,\gamma$ -Torsionswinkel im DNA-Rückgrat gelingt.<sup>[149]</sup> MD-Simulationen wurden zum einen für das achirale  $dT^{\text{DEACM}}$ -Derivat der Benchmark-Sequenz, sowie für die sperrig substituierten  $dT^{\text{DPMTC}}$ -Derivate in (*R*)- und (*S*)-Konfiguration durchgeführt (Abbildung 91). Gerade der große Unterschied in den Schmelzpunkten von fast 10 °C zwischen der DEACM- und der (*S*)-DPMTC-Modifikation ließ entsprechend signifikante Charakteristika in den simulierten Doppelhelixstrukturen erhoffen. Im ersten Schritt wurde überprüft, inwiefern sich das Anknüpfen einer photolabilen Schutzgruppe auf die Ausrichtung der modifizierten Thymidin-Nukleobase auswirkt, die entweder in die Basenstapelungen eingebettet sein oder aus der Doppelhelixstruktur hin zum Lösungsmittel gedreht werden kann („flipped out“). Zunächst wird allgemein festgestellt, dass die photolabil geschützten DNA-Oligonukleotide eine während der Simulationszeit stabile Doppelhelixstruktur ausbilden (Abbildung 92a). Es wurden für alle drei photolabile Modifikationen je zehn unabhängige Simulationen mit einer kumulativen Gesamtsimulationszeit von 6  $\mu\text{s}$  durchgeführt, bei der zu Beginn die Thymidin-Base in einer flipped out-Konformation vorlag. Für alle drei photolabile Modifikationen wurden spontane Rotationen der Nukleobasen in die Doppelhelix hinein beobachtet (DEACM: 4-mal, (*R*)-DPMTC: 5-mal und (*S*)-DPMTC 2-mal), wobei diese flipped in-Konformationen über die Simulationszeit stabil geblieben sind (es werden Nicht-Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen zum gegenüberliegenden Adenosin ausgebildet). Die beobachtete flipped in-Konformation steht darüber hinaus im Einklang mit den Ergebnissen von Steinert und Schäfer zur etwas kleineren NPE-Schutzgruppe auf Desoxycytidin.<sup>[141]</sup> Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob sperrige Substituenten allgemein aus der großen

Furche hinausorientiert oder in der Nähe der Watson-Crick-Basenpaare toleriert werden. In fünf Simulationen mit einer Gesamtsimulationszeit von 1  $\mu$ s wurde festgestellt, dass die achirale DEACM-Schutzgruppe aus der großen Furche hinaus ins Lösungsmittel orientiert vorliegt.



**Abb. 92** (a) Repräsentative Struktur der (S)-DPMTC-geschützten DNA **ODN4f** mit global stabiler Doppelhelixstruktur (B-DNA). Hervorgehobene Basenpaare sind A7-T24 (gelb), T8-A23 (orange) und A9-T22 (rot). Repräsentative Struktur von DEACM-geschützter DNA (b) und (S)-DPMTC-geschützter DNA **ODN4f** (c) mit Fokus auf dem modifizierten Thymidin T8. (d) Struktur von (R)-DPMTC-geschützter DNA **ODN4f** mit zu Beginn 180° rotierter Schutzgruppe (in die große Furche), die innerhalb der Simulationszeit in die energetisch günstigere Konformation zurückrotiert (e).

Dabei ergibt sich ein interessantes Strukturmerkmal: Die aromatische Cumarin-Gruppe geht eine  $\pi$ -stacking-Wechselwirkung mit dem gegenüberliegenden Thymidin ein (T22 in Abbildung 92b, rot), bei der im Gegenstrang im Zuckergerüst eine C3'-endo-Konformation eingenommen wird. Über die Trajektorie weist die DEACM-Gruppe eine gewisse Flexibilität auf, d.h. es wird Bindungsrotation in der großen Furche beobachtet. Demgegenüber scheinen die sperrig substituierten (R)- und (S)-DPMTC-Schutzgruppen vergleichsweise starr in die Doppelhelixstruktur eingebettet zu sein. Hier ragt in beiden Konfigurationen der sperrige Triazolrest aus der großen Furche hinaus ins Lösungsmittel, während der Cumarin-Rest über die gesamte Trajektorie senkrecht zum benachbarten Adenosin (A8) in Form einer „T-shape“-Struktur orientiert vorliegt (Abbildung 92c). In der (R)-Konfiguration kann der gesamte Diphenylrest am Triazolrest frei rotieren, während in der (S)-Konfiguration nur noch die Rotation der einzelnen Phenylreste auftritt. Um auszuschließen, dass die beobachteten Strukturen nicht durch die Wahl der Startgeometrie beeinflusst werden, sondern tatsächlich die günstigsten Konformationen darstellen, wurde eine weitere Simulation exemplarisch mit dem (R)-DPMTC-Derivat durchgeführt, bei der die Position des sperrigen Triazol-Restes und

die der Cumarin-Schutzgruppe durch Rotation um  $180^\circ$  ausgetauscht wurden (Abbildung 92d). Nach 150 ns Simulationszeit rotierte die Cumarin-Gruppe zurück in die T-shape-Geometrie, während der sperrige Diphenyl-Rest aus der großen Furche hinausragte (Abbildung 92e). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde nun ein Modell für die destabilisierende Wirkung der (sperrigen) photolabilen Schutzgruppen entwickelt: Sperrige Substituenten an der photolabilen Schutzgruppe zeigen generell aus der großen Furche heraus, während kleinere Substituenten in die Nähe der Basenpaarungen gepackt werden. Photolabile Schutzgruppen ohne sperrige Substitution in  $\alpha$ -Position, wie DEACM, pHP oder NPP, verzerren die lokale Doppelhelixstruktur und unterbrechen die durchgehende Basenstapelungen. Für planare, aromatische Derivate wie die DEACM-Schutzgruppe kann eine  $\pi$ -stacking-Wechselwirkung mit benachbarten Nukleobasen sogar einen stabilisierenden Beitrag zur Doppelhelixstruktur besitzen. Dies könnte ein Aspekt für den - trotz Destabilisierung gegenüber nativem Duplex - ungewöhnlich hohen Schmelzpunkt der DEACM-Modifikation von  $42,9^\circ\text{C}$  sein. Photolabile Schutzgruppen mit sperriger Substitution in  $\alpha$ -Position destabilisieren die lokale Doppelhelixstruktur, wobei zusätzlich ein großer, hydrophober Rest in das polare Lösungsmittel ausgerichtet wird. Diese ungünstige Ausrichtung kann einen Beitrag zur Erniedrigung der Schmelzpunkte leisten, wenn beispielsweise der hydrophobe Rest im Einzelstrang besser gegen das polare Lösungsmittel abgeschirmt werden kann (z.B. durch „stacking“). Schließlich macht die Art der sperrigen Substitution keinen großen Unterschied mehr, solange der sterische Anspruch des Triazol-Substituenten den der Cumarin- bzw. Nitrobenzyl-Gruppe übersteigt. In diesem Fall wird nämlich die Cumarin- bzw. Nitrobenzyl-Gruppe gegen die benachbarten Basenpaare gerichtet, während der Triazol-Substituent als sperrigster Rest aus der großen Furche hinausragt. Auf diese Weise lässt sich das Auftreten eines Plateaus von Schmelzpunkten um die  $34^\circ\text{C}$  erklären.

### 3.5.8 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieses Projektteils war es, den Duplex-destabilisierenden Effekt einer einzelnen photolabilen Schutzgruppe zu maximieren. Hierzu wurden Alkin-modifizierte photolabile Nitrobenzyl- und Cumarin-Schutzgruppen zentral in ein DNA-Oligonukleotid (Benchmarksequenz) eingebaut und anschließend postsynthetisch mit verschiedenen sperrigen Azid-Substituenten in einer CuAAC zur Reaktion gebracht. Die daraus resultierenden Triazol-substituierten sperrigen Derivate wurden anschließend mittels Schmelzpunktstudien hinsichtlich ihres Duplex-destabilisierenden Effekts untersucht. In der Schmelzpunktanalyse der Diastereomergemische kristallisierten sich mit dem Phenylethyl- und dem Diphenylmethyltriazol bereits zwei stark destabilisierende Struktur motive heraus. Eine Auftrennung nach den absoluten Konfigurationen zeigte, dass in allen sperrigen Substitutionen das jeweils (S)-konfigurierte Diastereomer die stärkste

Schmelzpunktniedrigung aufweist. Zusammen mit den Ergebnissen aus einer ähnlichen Studie von Steinert und Schäfer, in welcher ebenfalls das (S)-konfigurierte NPE-Derivat auf einem Desoxycytidin-Baustein stärker destabilisierend wirkte, lässt sich begründet annehmen, dass die (S)-Konfiguration in  $\alpha$ -Position im Allgemeinen die günstigere Konfiguration für das Design photolabiler Schutzgruppen darstellt. Als Ergebnis der Screenings wurde schließlich eine neue photolabile Schutzgruppe mit herausragenden Duplex-destabilisierenden Eigenschaften identifiziert. (S)-DPMTC (Diphenylmethyltriazolylcumarin) wies mit einer Schmelzpunktniedrigung von  $\Delta T_m = 15,8$  °C den größten, jemals auf der Benchmark-Sequenz für den Einbau einer einzigen photolabilen Schutzgruppe gemessenen Wert auf. Mit einer Photolyseeffizienz von  $\varepsilon(405\text{ nm}) \cdot \Phi = 258\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  besitzt die (S)-Konfiguration der DPMTC-Schutzgruppe außerdem gegenüber der (R)-Konfiguration die besseren Photolyseeigenschaften, die eine effiziente Anwendung mit Licht oberhalb von 400 nm gewährleisten. Mit Hilfe von MD-Simulationen wurde daraufhin die Wechselwirkung der sperrigen DPMTC-Schutzgruppen im Vergleich zur achiralen DEACM-Schutzgruppe untersucht und es konnten charakteristische Strukturelemente aufgelöst werden. Darauf aufbauend konnte auch erklärt werden, dass die sperrigen Substitutionen zu einem Plateau der Schmelztemperatur führen, weil der sperrige Triazol-Substituent diesen maßgeblich beeinflusst, indem er – (fast) unabhängig von der Art des sperrigen Rests – aus der großen Furche hinaus ins Lösungsmittel ragt. Mit der ebenfalls in diesem Projektteil entwickelten enantioselektiven Synthese lassen sich in Zukunft gezielt sperrige photolabile Schutzgruppen wie DPMTC mit definierter absoluter Konfiguration in hohen Ausbeuten herstellen. Durch den modularen Charakter der CuAAC-Reaktion können weitere interessante Reste mit der photolabilen Schutzgruppe temporär versehen werden, beispielsweise Reportermoleküle und Affinitätsmarker, hydrophobe Reste wie Cholesterol zur Erhöhung der Membrangängigkeit in Zellen, oder es kann eine Konjugation mit Biomolekülen wie Ziel- oder Transporterproteinen erfolgen, die durch Bestrahlung mit Licht wieder aufgehoben wird.

## 4. Experimenteller Teil

### 4.1 Materialien und Methoden

#### Allgemeine Arbeitstechniken

Reaktionen, die unter Inertbedingungen durchgeführt werden mussten, wurden unter Argonatmosphäre angesetzt und das Reaktionsgefäß mit einem Septum und aufgesetztem Argon-Ballon verschlossen. Verbindungen, die nicht an Luft stabil waren, wurden unter Argonatmosphäre bei -20 °C gelagert.

#### Lösungsmittel und Reagenzien

Es wurden für die Synthesen Lösungsmittel der Qualität p.a. (pro analysi), sofern nicht anders beschrieben, direkt ohne weitere Aufreinigung verwendet. Für die präparative Säulenchromatographie wurden im Allgemeinen Lösungsmittel technischer Qualität verwendet. Phosphoramidite, die im Anschluss für Oligonukleotid-Festphasensynthese verwendet werden sollten, wurden durch präparative Säulenchromatographie mit Lösungsmitteln der Qualität p.a. endaufgereinigt. Für das Arbeiten unter Ausschluss von (Luft-)Feuchtigkeit wurden ausschließlich absolutierte und unter Inertbedingungen gelagerte Lösungsmittel verwendet. Gekaufte Reagenzien der Firmen *Sigma Aldrich*, *Acros*, *Fluka*, *TCI Chemicals* und *Carbosynth* wurden ohne weitere Aufreinigung direkt in den Synthesen verwendet.

#### Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographie erfolgte zur Untersuchung des Reaktionsfortschrittes, sowie als Hilfsmittel bei der Durchführung präparativer Säulenchromatographie. Hierfür wurden 0,2 mm Kieselgel 60 DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV<sub>254</sub> der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Die Detektion erfolgte mit 254 nm UV-Licht bzw. durch Anfärben mit einer Anisaldehyd-Färbelösung (10 ml *p*-Anisaldehyd, 5 ml Eisessig, 420 ml Ethanol und 15 ml konz. Schwefelsäure), mit Ninhydrin-Reagenz (0,6 g Ninhydrin, 2 ml Eisessig, 13 ml Wasser und 420 ml *n*-Butanol) und anschließendem Erhitzen mit einem Heißluftgebläse.

#### Präparative Säulenchromatographie

Die Aufreinigung der Rohprodukte erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, durch präparative Säulenchromatographie. Hierzu wurde Kieselgel 60 der Firma *Merck* (Korngröße 0,04 – 0,06 mm) verwendet. Als Laufmittel für die mobile Phase wurden Lösungsmittelgemische

verwendet, deren Zusammensetzung in den Versuchsdurchführungen jeweils als Volumenverhältnisse (v/v) angegeben ist.

### **NMR-Spektroskopie**

Die Messungen der NMR-Spektren wurden an folgenden Spektrometern der Firma *Bruker* durchgeführt:

Bruker AM 250: (250 MHz  $^1\text{H}$ -NMR)

Bruker AV 300: (300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR, 75.5 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR und 121.5 MHz  $^{31}\text{P}$ -NMR)

Bruker AV 400: (400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR, 100.6 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR)

Bruker AV 500: (500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR, 125.8 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR und 202.5 MHz  $^{31}\text{P}$ -NMR)

Die Zuordnung der Signale erfolgte teilweise unter Zuhilfenahme von 2D-NMR-Experimenten:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC.

Die chemische Verschiebung  $\delta$  wird in ppm, der Betrag der Kopplungskonstanten  $J$  in Hertz angegeben. Per Definition entspricht ein positives Vorzeichen von  $\delta$  einer Tieffeldverschiebung des Signals relativ zum Referenzsignal. Zur Kalibrierung der Signale wurden Tetramethylsilan und als interner Standard die chemische Verschiebung des Protonensignals des jeweiligen Lösungsmittels verwendet.

Die Verschiebung der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Signale ist relativ zu 85%-ger Phosphorsäure als externer Standard angegeben.

Die Signalmultiplizitäten werden folgendermaßen abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett, t = Triplett, dt = Dublett vom Triplett, q = Quartett, pt = Pseudotriplett, pq = Pseudoquartett, sept. = Septett, m = Multiplett, bs = breites Singulett.

### **Massenspektrometrie**

ESI-Massenspektrometrie chemischer Verbindungen wurde mit einem Surveyor MSQ ESI Massenspektrometer der Firma *Thermo Fisher Scientific* durchgeführt. Für hochauflösende Massenspektrometrie wurde ein MALDI LTQ Orbitrap XL Messgerät der Firma *Thermo Fisher Scientific* verwendet.  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure dienen hierbei als Matrix. Für die Massenspektrometrie von Oligonukleotiden wurde ein micrOTOF-Q Gerät der Firma *Bruker* (Negativmodus) verwendet.

### **Chirale HPLC**

Für die Analytik chiraler Verbindungen wurde eine Chiralcel OJ-R 250 x 4,6 mm-Säule mit isokratischem Laufmittelgemisch (Hexan/Ethanol) verwendet. Für die präparative chirale HPLC wurde eine CHIRALPAK-IA 20 x 250 mm der Firma *Chiralcel* mit isokratischem Laufmittelgemisch (Hexan/Ethanol) verwendet.

### **Reversed Phase HPLC**

DNA- und RNA-Oligonukleotide wurden mit Hilfe von RP-HPLC an einem *Agilent Technologies 1260 Infinity*-Gerät aufgereinigt und analysiert. Als Laufmittel kamen typischerweise ein Gradient aus Acetonitril und wässrigem 0,1 M Triethylammoniumacetat-Puffer zum Einsatz.

### **UV/Vis-Spektroskopie**

UV/Vis-Spektren wurden mit Hilfe eines Evolution 300-Geräts der Firma *Thermo Fisher Scientific* aufgenommen. Konzentrationsbestimmungen der Oligonukleotid-Lösungen wurden an einem NanoDrop 2000-Gerät der Firma *Thermo Fisher Scientific* durchgeführt.



## 4.2 Synthesevorschriften

### 4.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

#### AAV1: Synthese der Mosher-Ester-Derivate 124 und 125

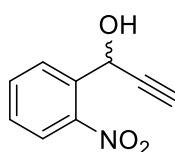
Der jeweilige Schutzgruppen-Alkohol (1 eq.) wurde unter Argon zusammen mit abs. Pyridin (3,1 eq.) in Dichlormethan (1,6 ml / 0,1 mmol Alkohol) gelöst. Daraufhin wurde (*R*)- bzw. (*S*)-MTPA-Chlorid (1,9 eq.) hinzugefügt und die Reaktionslösung für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt.

#### AAV2: Synthese der Azid-Bibliothek-Verbindungen 107-113

Das jeweilige Bromid-Derivat (1 eq.) wurde zusammen mit Natriumazid (1,5-1,7 eq.) in abs. DMF gelöst (10 ml/1 mmol) und für 6-9 Stunden bei 70 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit einer 1:1-Mischung aus Diethylether/Wasser verdünnt und je dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

### 4.2.2 Synthese der photolabilen Schutzgruppen-Vorläufer

#### Synthese von 1-(2-Nitrophenyl)prop-2-in-1-ol (42)



42

$C_9H_7NO_3$   
177,04 g/mol

In einem ausgeheizten Schlenkrohr wurde 2-Nitrobenzaldehyd (152 mg, 1 mmol, 1 eq.) in 1 ml abs. THF gelöst. Die Lösung wurde in einem Eisbad auf 0 °C gekühlt und unter Rühren Ethynylmagnesiumbromid (2,4 ml einer 0,5 M Lösung in THF, 1,2 mmol, 1,2 eq.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann durch Zugabe von 7 ml ges. Ammoniumchlorid-Lösung die Reaktion beendet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 10 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen

Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde als braunes Öl erhalten und direkt weiter umgesetzt.

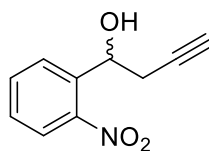
Ausbeute: 170 mg (0,96 mmol, 96%)

DC (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1):  $R_f = 0,15$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,01\text{-}7,98$  (m, 2H,  $H_{ar.}$ ), 7,70 (t,  $J = 7,6$  Hz, 1H,  $H_{ar.}$ ), 7,53 (t,  $J = 7,6$  Hz, 1H,  $H_{ar.}$ ), 6,04 (s, 1H,  $\text{PhCHOH}$ ), 2,65 (s, 1H,  $\text{CCH}$ ) ppm.

Die spektroskopischen Daten entsprechen zuvor publizierten Daten in der Literatur.<sup>[150]</sup>

### Synthese von 1-(2-Nitrophenyl)but-3-in-1-ol (**43**)



**43**

$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_3$   
191,06 g/mol

11 g Zink wurden mit 9,9 ml dest. Wasser und 1,1 ml konz. HCl versetzt und für 20 Minuten gerührt. Daraufhin wurde die wässrige Phase abdekantiert und der Rückstand konsekutiv je dreimal mit ca. 28 ml Wasser, 17 ml Aceton und 11 ml Diethylether gewaschen. Das so erhaltene aktivierte Zink wurde für eine Stunde im Vakuum getrocknet und dann in 160 ml abs. DMF suspendiert. Die Suspension wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und daraufhin Propargylbromid (10,7 ml, 99 mmol, 1,5 eq.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde bei 0 °C gerührt und dann 2-Nitrobenzaldehyd (10 g, 66 mmol, 1 eq.) unter Rühren hinzugefügt. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 ml ges. Ammoniumchlorid-Lösung beendet. Es wurde dreimal mit 200 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und nach Filtration das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1). Verbindung **43** wurde als braunes Öl erhalten.

Ausbeute: 9,6 g (50,2 mmol, 76%)

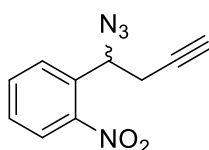
DC (Cyclohexan/Ethylacetat 3:2):  $R_f = 0,55$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,98$  (dd,  $J = 8,2, 1,2$  Hz, 1H,  $H_{ar.}$ ), 7,90 (dd,  $J = 7,9, 1,2$  Hz, 1H,  $H_{ar.}$ ), 7,69 (dt,  $J = 7,6, 1$  Hz, 1H,  $H_{ar.}$ ), 7,48 (m, 1H,  $H_{ar.}$ ), 5,49 (dd,  $J = 7,2, 4,5$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2$ ), 2,94 (ddd,  $J = 16,9, 4,5, 2,7$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2$ ), 2,69 (ddd,  $J = 16,9, 7,2, 2,7$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 2,12 (t,  $J = 2,6, 1$  Hz,  $\text{CCH}$ ) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100,61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 137,7, 133,6, 128,7, 128,2, 124,5, 116,6, 79,7, 71,8, 67,5, 28,5$  ppm.

Die spektroskopischen Daten entsprechen zuvor publizierten Daten in der Literatur.<sup>[119]</sup>

### Synthese von 1-(1-Azidbut-3-in-1-yl)-2-nitrobenzol (**49**)



**49**

$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_2$   
216,20 g/mol

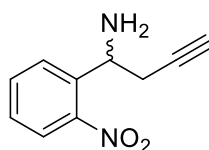
Verbindung **43** (9,56 g, 50 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit Triphenylphosphin (19,67 g, 75 mmol, 1,5 eq.) unter Argon in 180 ml abs. THF gelöst. Das Gemisch wurde auf  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt und dann Diisopropylazodicarboxylat (DIAD, 14,77 ml, 75 mmol, 1,5 eq.) hinzugegeben. Nach 10 Minuten Rührzeit wurde Diphenoxyphosphorylazid (DPPA, 16,16 ml, 3 mmol, 1,5 eq.) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden weitergerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 6:1  $\rightarrow$  DCM/MeOH 10:1). Das Produkt wurde als braunes Öl erhalten mit DPPA-Verunreinigung erhalten.

Ausbeute: 5,19 g (24 mmol, 48%)

DC (Cyclohexan/Ethylacetat 6:1):  $R_f = 0,5$

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,88$  (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ),  $7,65$  (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ),  $7,58$  (t,  $J = 8,1$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ),  $7,39$  (t,  $J = 8,1$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ),  $5,37$  (dd,  $J = 6,9, 5,4$  Hz, 1H,  $\text{N}_3\text{-CHCH}_2$ ),  $2,78\text{-}2,56$  (m, 2H,  $\text{OCHCH}_2$ ),  $2,01$  (t,  $J = 2,6$ , 1H, CCH) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (100,61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 149,9, 133,8, 133,7, 130,1, 129,0, 124,8, 120,3, 72,0, 59,1, 26,9$  ppm.

**Synthese von 1-(2-Nitrophenyl)but-3-in-1-amin (50)****50**

C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
190,20 g/mol

Verbindung **49** (1,29 g, 6 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit Triethylamin (10,56 ml, 83,3 mmol, 14 eq.) in 40 ml Methanol vorgelegt und dazu Propandithiol (7,61 ml, 83,3 mmol, 14 eq.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 23 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurden 150 ml Wasser/Methanol (1:1) hinzugefügt und durch Zugabe von 125 ml 1 M HCl-Lösung angesäuert. Es wurde zweimal mit je ca. 220 ml DCM gewaschen und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde mit 150 ml 1 M NaOH versetzt und mit DCM extrahiert. Hieraus wurde Verbindung **50** als Reinprodukt erhalten (1,107 g, 5,82 mmol, 97%).

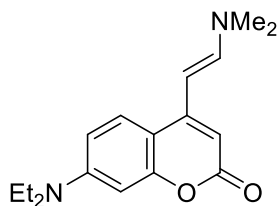
Ausbeute: 1,107 g (5,82 mmol, 97%)

DC (DCM/MeOH 10:1): R<sub>f</sub> = 0,5

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,82-7,87 (m, 2H, H<sub>ar.</sub>), 7,63 (dt, J = 7,6, 1,3 Hz, 1H, H<sub>ar.</sub>), 7,42 (dt, J = 7,6, 1,3 Hz, 1H, H<sub>ar.</sub>), 4,69 (dd, J = 7,2, 5,0 Hz, 1H, NH<sub>2</sub>-CHCH<sub>2</sub>), 2,78 (ddd, J = 16,0, 5,0, 2,6 Hz, 1H, OCHCH<sub>2</sub>), 2,78 (ddd, J = 16,0, 7,2, 2,6 Hz, 1H, OCHCH<sub>2</sub>), 2,07 (t, J = 2,6, 1H, CCH) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125,77 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 149,0, 138,9, 133,0, 128,2, 128,1, 124,2, 80,6, 71,3, 49,1, 28,4 ppm.

MALDI-HRMS: m/z berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 191,08150, gefunden 191,08144 (Δm = 0,00006, relativer Fehler Δm/m = 0,3 ppm)

**Synthese von 7-(Diethylamino)-4-[(E)-2-(dimethylamino)ethenyl]-2H-chromen-2-on (53)****53**

C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
286,17 g/mol

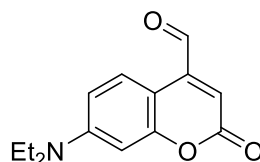
7-Diethylamino-4-methylcumarin (9,24 g, 40 mmol, 1 eq.) wurde mit aufgesetztem Rückflusskühler unter Argon in 80 ml abs. DMF gelöst und mit DMF-DMA (7,16 g, 60 mmol, 1,5 eq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für acht Stunden zum Sieden erhitzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, wobei ein gelber Feststoff ausfiel. Dieser besteht aus reinem Produkt **53** und wurde abfiltriert (6,48 g, 22,6 mmol, 57%). Das Filtrat wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt, die org. Phase abgetrennt und die wässrige jeweils dreimal mit je 30 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Trocknungsmittel abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/EE 19:1 -> 10:1, dann DCM/MeOH 9:1 zum Eluieren des Reinprodukts). Verbindung **53** wurde in Form brauner Kristalle isoliert (4,27 g, 14,9 mmol, 37%).

Ausbeute: 10,75 g (37,5 mmol, 94%)

DC (DCM/MeOH 9:1):  $R_f = 0,3$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 7,72\text{-}7,64$  (m, 2H, 5-H +  $\text{Me}_2\text{NCHCH}$ ), 6,60 (dd,  $J = 9,0$ , 2,5 Hz, 1H, 6-H), 6,40 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H, 8-H), 5,82 (s, 1H, 3-H), 5,29 (d,  $J = 13$  Hz, 1H,  $\text{Me}_2\text{NCHCH}$ ), 3,42-3,38 (q,  $J = 7,0$  Hz, 4H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 3,00 (s, 6H,  $\text{Me}_2\text{NCHCH}$ ), 1,12 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

#### Synthese von 7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-carbaldehyd (**54**)



**54**

$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_3$   
245,28 g/mol

Verbindung **53** (10,75 g, 37,5 mmol, 1 eq.) wurde in 400 ml THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1) suspendiert und unter starkem Rühren mit Natriumperodat (23,95 g, 112,5 mmol, 3 eq.) versetzt. Nach zwei Stunden wurde das Reaktionsgemisch über Kieselgel abfiltriert und der Filtrerrückstand wurde mit Ethylacetat nachgewaschen. Das Lösungsmittelgemisch wurde im Vakuum eingeeengt und dann mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 ml DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Rohprodukt wurde in quantitativer Ausbeute erhalten und war rein genug, um es direkt für Folgereaktionen einzusetzen. Ein Reinprodukt wurde über säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/Ethylacetat 19:1) in Form von dunkelroten Kristallen erhalten.

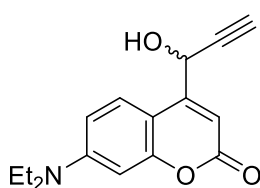
Ausbeute: 6,4 g (26,1 mmol, 70%)

DC (DCM/Ethylacetat 19:1):  $R_f = 0,7$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 10,06$  (s, 1H, CHO), 8,40 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H, 5-H), 6,82 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H, 6-H), 6,73 (s, 1H, 8-H), 6,55 (s, 1H, 3-H), 3,43-3,38 (q,  $J = 7,1$  Hz, 4H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 1,25 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

Die spektroskopischen Daten entsprechen publizierten Daten in der Literatur.<sup>[124]</sup>

### Synthese von 7-Diethylamino-4-(1-hydroxyprop-2-yn-1-yl)-2H-chromen-2-on (55)



**55**

$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3$   
271,32 g/mol

In einem ausgeheizten Schlenkrohr wurde Verbindung **54** (245 mg, 1 mmol, 1 eq.) in 1 ml abs. THF gelöst. Die Lösung wurde in einem Eisbad auf 0 °C gekühlt und unter Rühren Ethynylmagnesiumbromid (2,4 ml einer 0,5 M Lösung in THF, 1,2 mmol, 1,2 eq.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und dann durch Zugabe von 7 ml ges. Ammoniumchlorid-Lösung die Reaktion beendet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 25 ml Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/Ethylacetat 19:1 -> 3:1) und Verbindung **55** als braunes Öl erhalten.

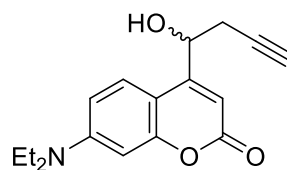
Ausbeute: 133 mg (0,49 mmol, 49%)

DC (DCM/Ethylacetat 10:1):  $R_f = 0,25$

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,69$  (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H, 5-H), 6,75 (d,  $J = 7,1$  Hz, 1H, 6-H), 6,63 (s, 1H, 8-H), 6,47 (s, 1H, 3-H), 5,64 (s, 1H, CHOH), 3,41-3,41 (q,  $J = 7,1$  Hz, 4H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 2,72 (d,  $J = 2,3$  Hz, 1H, CCH), 1,23 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}^+]^+$  272,12812, gefunden 272,12798

( $\Delta m = 0,00014$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 0,5$  ppm)

**Synthese von 7-Diethylamino-4-(1-hydroxybut-3-in-1-yl)-2H-chromen-2-on (56)****56**

$C_{17}H_{19}NO_3$   
285,34 g/mol

12,03 g (184 mmol, 2 eq.) Zink wurde mit 10,8 ml dest. Wasser und 1,2 ml konz. HCl versetzt und für 60 Minuten gerührt. Daraufhin wurde die wässrige Phase abdekantiert und der Rückstand konsekutiv je dreimal mit ca. 40 ml Wasser, 40 ml Aceton und 40 ml Diethylether gewaschen. Das so erhaltene aktivierte Zink wurde für 50 Minuten im Vakuum getrocknet und dann in 250 ml abs. DMF suspendiert. Die Suspension wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und daraufhin Propargylbromid (12,1 ml, 138 mmol, 1,5 eq.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde bei 0 °C gerührt und dann Aldehyd **54** (22,57 g, 92 mmol, 1 eq.) unter Rühren hinzugefügt. Nach 60 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 ml ges. Ammoniumchlorid-Lösung beendet. Die Lösung wurde über Kieselgel abfiltriert und dann dreimal mit 200 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach Filtration das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/Aceton 10:1). Verbindung **56** wurde als brauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 22,23 g (77,9 mmol, 85%)

DC (DCM/Aceton 10:1):  $R_f = 0,5$

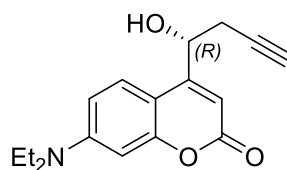
$^1H$ -NMR (250 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 7,40$  (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H, 5-H), 6,59 (dd,  $J = 9,0, 2,6$  Hz, 1H, 6-H), 6,53 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1H, 8-H), 6,30 (d,  $J = 0,8$  Hz, 1H, 3-H), 5,17-5,10 (m, 1H,  $CHOH$ ), 3,45-3,39 (q,  $J = 7,1$  Hz, 4H,  $N(CH_2CH_3)_2$ ), 2,85 (ddd,  $J = 16,9, 4,2, 2,5$  Hz, 1H,  $CH_2CHOH$ ), 2,65 (ddd,  $J = 16,9, 7,7, 2,6$  Hz, 1H,  $CH_2CHOH$ ), 2,56 (d,  $J = 4,3$  Hz, 1H, OH), 2,18 (t,  $J = 2,5$  Hz, 1H, CCH), 1,22 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H,  $N(CH_2CH_3)_2$ ) ppm.

$^{13}C$ -NMR (100,61 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 162,2, 156,5, 155,2, 150,5, 124,6, 108,6, 105,9, 105,8, 98,1, 79,3, 72,3, 68,0, 44,7, 27,8, 12,4$  ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $C_{17}H_{20}NO_3$   $[M+H]^+$  286,14377, gefunden 286,14399

( $\Delta m = 0,00022$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 0,8$  ppm)

### Synthese von 7-Diethylamino-4-((1*R*)-1-hydroxybut-3-in-1-yl)-2*H*-chromen-2-on ((*R*)-56)



**(*R*)-56**

C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>  
285,34 g/mol

Aldehyd **54** (66 mg, 0,27 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit (*R*)-TRIP-Katalysator **123** (20 mg, 0,027 mmol, 0,1 eq.) über trockenem Molekularsieb (200 mg, 4 Å) im Vakuum getrocknet und dann in 3 ml einer Cyclohexan/Dichlormethan-Mischung (4:1) gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde auf 0 °C gekühlt und dann Allenylborsäurepinakolester (0,1 ml, 0,56 mmol, 2 eq.) hinzugefügt. Es wurde für 48 Stunden bei 0 °C weitergerührt und die Reaktionslösung anschließend direkt säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Aceton 7:1). Das Produkt wurde als gelbes Öl isoliert. Der Enantiomerenüberschuss wurde durch HPLC bestimmt unter Verwendung einer Chiralcel OJ-R Säule (20% Ethanol in Hexan, Flussrate 0,5 ml/min),  $t_{\max} = 43.1$  min,  $t_{\min} = 34.5$  min.  $[\alpha]_D^{20} = +41.5$  (CHCl<sub>3</sub>, 24 °C).

Ausbeute: 59 mg (0,21 mmol, 89%)

ee: 88%

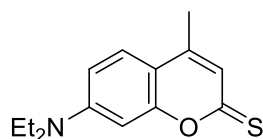
DC (DCM/Aceton 7:1):  $R_f = 0,5$

<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7,40$  (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H, 5-H), 6,59 (dd,  $J = 9,0, 2,6$  Hz, 1H, 6-H), 6,53 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1H, 8-H), 6,30 (d,  $J = 0,8$  Hz, 1H, 3-H), 5,17-5,10 (m, 1H, CHOH), 3,45-3,39 (q,  $J = 7,1$  Hz, 4H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,85 (ddd,  $J = 16,9, 4,2, 2,5$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CHOH), 2,65 (ddd,  $J = 16,9, 7,7, 2,6$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CHOH), 2,56 (d,  $J = 4,3$  Hz, 1H, OH), 2,18 (t,  $J = 2,5$  Hz, 1H, CCH), 1,22 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 286,14377, gefunden 286,14399

( $\Delta m = 0,00022$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 0,8$  ppm)



**Synthese von 7-(Diethylamino)-4-methyl-2H-chromen-2-thion (57)****57**C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NOS  
247,36 g/mol

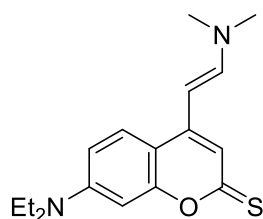
7-Diethylamino-4-methylcumarin (2,31 g, 10 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit Lawesson's Reagenz (2,67 g, 6,6 mmol, 0,66 eq.) unter Argon in Toluol vorgelegt und zum Sieden erhitzt. Die Reaktionslösung wurde für sieben Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM 100%).

Ausbeute: 2,43 g (9,82 mmol, 98%)

DC (DCM): R<sub>f</sub> = 0,65

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,45 (d, J = 9,8 Hz, 1H, 5-H), 6,94 (s, 1H), 6,70-6,66 (m, 2H), 3,44 (q, J = 7,1 Hz, 4H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,23 (t, J = 7,1 Hz, 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

Die spektroskopischen Daten entsprechen publizierten Daten in der Literatur.<sup>[151]</sup>

**Synthese von 7-(Diethylamino)-4-[(E)-2-(dimethylamino)ethenyl]-2H-chromen-2-thion (58)****58**C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>OS  
302,44 g/mol

Verbindung **57** (1,24 g, 5 mmol, 1 eq.) wurde unter Argon in 8,5 ml abs. DMF gelöst und dazu DMF-DMA (1 ml, 7,5 mmol, 1,5 eq.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für zwei Stunden zum Sieden erhitzt. Nach Zugabe von ges. Natriumhydrogencarbonatlösung fiel ein dunkler Niederschlag aus, der abfiltriert und direkt einer säulenchromatographischen Aufreinigung

unterzogen wurde (DCM/EE 19:1 -> 10:1). Verbindung **58** wurde als brauner, grün schimmernder Feststoff isoliert.

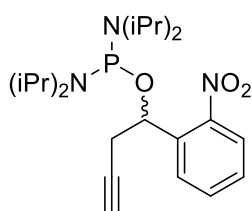
Ausbeute: 550 mg (0,18 mmol, 36%)

DC (DCM/Ethylacetat 19:1):  $R_f = 0,4$

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,57$  (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H, 5-H),  $7,44$  (d,  $J = 12,8$  Hz, 1H,  $\text{Me}_2\text{NCHCH}$ ),  $7,03$  (s, 1H),  $6,67$ - $6,61$  (m, 2H),  $5,30$  (d,  $J = 12,8$  Hz, 1H,  $\text{Me}_2\text{NCHCH}$ ),  $3,43$  (q,  $J = 7,1$  Hz, 4H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ),  $3,07$  (s, 6H,  $\text{Me}_2\text{N}$ ),  $1,22$  (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_1\text{S}_1$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  303,15256, gefunden 303,15278 ( $\Delta m = 0,00022$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 0,7$  ppm)

### Synthese von 1-(2-Nitrophenyl)-but-3-in-1-yl-*N,N,N,N*-tetraisopropylphosphordiamidite (**99**)



**99**

$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_3\text{P}$   
421,52 g/mol

NPBY-Alkohol **43** (96 mg, 0,5 mmol, 1 eq.) wurde unter Argon mit Triethylamin (0,14 ml, 1 mmol, 2 eq.) in 1,5 ml abs. Diethylether gelöst und dazu Bis(diisopropylamino)chlorphosphin (134 mg, 0,5 mmol, 1 eq.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für acht Stunden gerührt und dann im Argon-Strom der Diethylether verflüchtigt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Ethylacetat 9:1), wobei dem Laufmittel zu Beginn 1V%  $\text{NEt}_3$  zur Deaktivierung des Kieselgels hinzugefügt wurde.

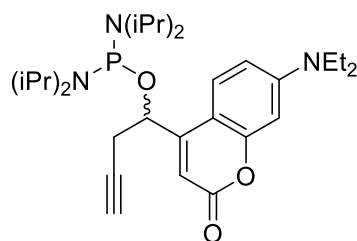
Ausbeute: 100 mg (0,24 mmol, 47%)

DC (Dichlormethan/Ethylacetat 9:1):  $R_f = 0,7$

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,01$ - $7,93$  (m, 2H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ),  $7,68$ - $7,62$  (m, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ),  $7,46$ - $7,42$  (m, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ),  $5,51$ - $5,47$  (2xt,  $J = 5$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CCH}$ ),  $3,67$ - $3,42$  (m, 4H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ),  $2,98$ - $2,67$  (m, 2H,  $\text{OCHCH}_2\text{CCH}$ ),  $1,94$  (t,  $J = 2,7$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CCH}$ ),  $1,24$ - $1,00$  (m, 24H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$  (202,48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 150,2$ ,  $148,4$  ppm.

**Synthese von 1-[7-(Diethylamino)cumarin-4-yl]but-3-in-1-yl-*N,N,N,N*-tetraisopropylphosphordiamidite (98)**



**98**

$C_{29}H_{46}N_3O_3P$   
515,68 g/mol

Bis(diisopropylamino)chlorphosphin (2,05 g, 7,65 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit Triethylamin (4,5 ml, 60,9 mmol, 8 eq.) in 75 ml abs. THF gelöst und hierzu eine Lösung von DEACBY-Alkohol **56** (2,04 g, 7,19 mmol, 0,94 eq.) in 38 ml abs. THF über einen Zeitraum von 20 Minuten langsam hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde daraufhin abfiltriert und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Ein Aliquot (0,5 eq.) des Rückstands wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Ethylacetat 4:1), wobei dem Laufmittel zu Beginn 1V%  $NEt_3$  zur Deaktivierung des Kieselgels hinzugefügt wurde. Das Produkt wurde als orangefarbener Schaum erhalten.

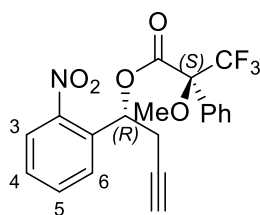
Ausbeute: 1,22 g (2,4 mmol, 63%)

DC (Dichlormethan/Ethylacetat 6:1):  $R_f = 0,35$

$^1H$ -NMR (250 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 7,44$  (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H, DEACBY-H-5), 6,58-6,52 (m, 2H, DEACBY-H6+DEACBY-H8), 6,35 (s, 1H, DEACBY-H3), 5,06-4,97 (m, 1H,  $OCHCH_2CCH$ ), 3,68-3,47 (m, 4H,  $CH(CH_3)_2$ ), 3,41 (q,  $J = 7,1$  Hz, 4H,  $N(CH_2CH_3)_2$ ), 2,93-2,67 (m, 2H,  $OCHCH_2CCH$ ), 1,97 (t,  $J = 2,6$  Hz, 1H,  $OCHCH_2CCH$ ), 1,28-1,05 (m, 24H,  $CH(CH_3)_2$ ) ppm.

$^{13}C$ -NMR (150,95 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 162,4, 155,5, 125,0, 108,3, 107,5, 106,3, 101,2, 98,1, 79,5, 71,6, 45,3, 45,2, 44,8, 2 \times 44,7, 27,5, 24,5, 2 \times 24,4, 2 \times 24,3, 24,2, 12,5$  ppm.

### Synthese von (1*R*)-1-(2-Nitrophenyl)but-3-in-1-yl-(2*S*)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat ((*R,S*)-124)



**(*R,S*)-124**

$C_{20}H_{16}F_3NO_5$   
407,35 g/mol

Die Synthese erfolgte gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift AAV1 mit 126  $\mu\text{mol}$  NPBY-Alkohol (*R*)-**43** und 239  $\mu\text{mol}$  (*R*)-MTPA-Cl.

Ausbeute: 24 mg (quantitative Umsetzung)

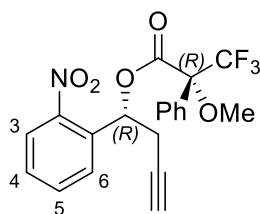
DC (Cyclohexan/Ethylacetat 6:1):  $R_f = 0,35$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,08\text{-}8,04$  (m, 1H,  $H_{\text{ar.}}\text{-}3$ ),  $7,51\text{-}7,46$  (m, 4H,  $H_{\text{ar.}}\text{-}4 + H_{\text{ar.}}\text{-}6 + 2 \times \textit{ortho}\text{-Ph}$ ),  $7,45\text{-}7,42$  (m, 1H, *para*-Ph),  $7,38\text{-}7,35$  (m, 2H, *meta*-Ph),  $7,30\text{-}7,26$  (m, 1H,  $H_{\text{ar.}}\text{-}5$ ),  $6,67\text{-}6,65$  (m, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CCH}$ ),  $3,65$  (m, 3H,  $\text{OCH}_3$ ),  $3,06\text{-}3,01$  (m, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CCH}$ ),  $2,90\text{-}2,85$  (m, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CCH}$ ),  $2,09$  (t,  $J = 2,7$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CCH}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125,77 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 165,4, 147,4, 133,7, 133,6, 131,7, 129,7, 129,4, 128,3, 127,9, 127,2, 124,8, 123,3$  (q,  $^1J = 290$  Hz),  $84,4$  (q,  $^2J = 28$  Hz),  $78,7, 71,6, 71,5, 2 \times 56,0, 29,7, 25,8$  ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$  (470,64 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = -71,3$  ppm.

### Synthese von (1*R*)-1-(2-Nitrophenyl)but-3-in-1-yl-(2*R*)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat ((*R,R*)-124)



**(*R,R*)-124**

$C_{20}H_{16}F_3NO_5$   
407,35 g/mol

Die Synthese erfolgte gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift AAV1 mit 126  $\mu\text{mol}$  NPBY-Alkohol (*R*)-**43** und 239  $\mu\text{mol}$  (*S*)-MTPA-Cl.

Ausbeute: 24 mg (quantitative Umsetzung)

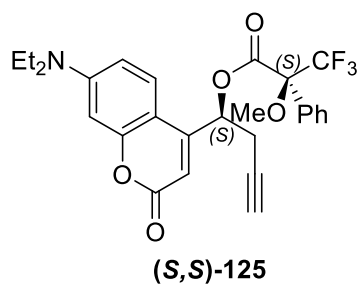
DC (Cyclohexan/Ethylacetat 6:1):  $R_f = 0,35$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,09\text{-}8,07$  (m, 1H,  $\text{H}_{\text{ar.}-3}$ ),  $7,51\text{-}7,46$  (m, 2H,  $\text{H}_{\text{ar.}-5} + \text{H}_{\text{ar.}-6}$ ),  $7,55\text{-}7,53$  (m, 1H,  $\text{H}_{\text{ar.}-4}$ ),  $7,51\text{-}7,50$  (m, 2H, *ortho*-Ph),  $7,45\text{-}7,38$  (m, 3H, *meta*-Ph + *para*-Ph),  $6,74\text{-}6,72$  (dd,  $J = 6,6, 4,5$ , Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CCH}$ ),  $3,53$  (m, 3H,  $\text{OCH}_3$ ),  $3,04$  (ddd,  $J = 17,3, 4,5, 2,7$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CCH}$ ),  $2,91$  (ddd,  $J = 17,3, 6,6, 2,7$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CCH}$ ),  $1,96$  (t,  $J = 2,7$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CCH}$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125,77 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 165,5, 147,4, 133,7, 133,5, 131,3, 129,8, 129,5, 128,5, 128,3, 127,7, 127,2, 124,9, 123,1$  (q,  $^1J = 288$  Hz),  $84,8$  (q,  $^2J = 29$  Hz),  $77,9, 71,7, 71,0, 2 \times 55,5, 29,7, 25,8$  ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$  (470,64 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = -71,6$  ppm.

### Synthese von (1S)-1-[7-(Diethylamino)cumarin-4-yl]but-3-in-1-yl-(2S)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat ((S,S)-125)



$\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{NO}_5$   
501,50 g/mol

Die Synthese erfolgte gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift AAV1 mit 100  $\mu\text{mol}$  DEACBY-Alkohol (S)-**56** und 190  $\mu\text{mol}$  (R)-MTPA-Cl.

Ausbeute: 49 mg (98  $\mu\text{mol}$ , 98%)

DC (Dichlormethan/Aceton 100:1):  $R_f = 0,4$

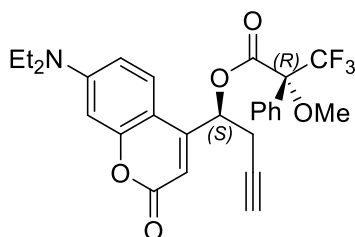
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,53$  (d,  $J = 7,1$  Hz, 2H,  $2 \times$  *ortho*-Ph),  $7,44\text{-}7,38$  (m, 4H, *para*-Ph,  $2 \times$  *meta*-Ph, DEACBY-H5),  $6,58$  (dd,  $J = 9,1, 2,5$ , Hz, 1H, DEACBY-H6),  $6,53$  (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H, DEACBY-H8),  $6,34$  (dd,  $J = 6,8, 5,4$ , Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CCH}$ ),  $6,10$  (s, 1H, DEACBY-H3),  $3,53$  (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ),  $3,42$  (q,  $J = 7,1$  Hz, 4H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ),  $2,88$  (ddd,  $J = 17,3, 5,4, 2,6$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CCH}$ ),  $2,79$  (ddd,  $J = 17,2, 6,9, 2,6$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CCH}$ ),  $1,99$  (t,  $J = 2,6$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CCH}$ ),  $1,21$  (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125,77 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 165,7, 161,4, 156,6, 150,7, 150,6, 131,4, 129,8, 128,7, 128,5, 127,5, 124,6, 123,1$  (q,  $J = 289$  Hz),  $108,8, 106,8, 105,1, 98,1, 84,7$  (q,  $J = 28$  Hz),  $77,3, 72,2, 70,9, 2 \times 55,6, 53,4, 44,8, 30,9, 29,6, 25,0, 12,4$  ppm.

$^{19}\text{F}$ -NMR (470,64 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = -71,2$  ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{NO}_5$   $[\text{M}+\text{H}^+]^+$  502,18358, gefunden 502,18298  
( $\Delta m = 0,00060$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 1,2$  ppm)

### Synthese von (1*S*)-1-[7-(Diethylamino)cumarin-4-yl]but-3-in-1-yl-(2*R*)-3,3,3-trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat ((*S,R*)-125)



**(*S,R*)-125**

$\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{NO}_5$   
501,50 g/mol

Die Synthese erfolgte gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift AAV1 mit 100  $\mu\text{mol}$  DEACBY-Alkohol (*S*)-**56** und 190  $\mu\text{mol}$  (*S*)-MTPA-Cl.

Ausbeute: 48 mg (98  $\mu\text{mol}$ , 98%)

DC (Dichlormethan/Aceton 100:1):  $R_f = 0,45$

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,53$  (d,  $J = 7,6$  Hz, 2H, 2x *ortho*-Ph), 7,43-7,33 (m, 4H, *para*-Ph, 2x *meta*-Ph, DEACBY-H5), 6,54 (dd,  $J = 8,9, 2,6$  Hz, 1H, DEACBY-H6), 6,51 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H, DEACBY-H8), 6,28 (dd,  $J = 7,8, 4,8$  Hz, 1H, OCHCH<sub>2</sub>CCH), 5,81 (s, 1H, DEACBY-H3), 3,68 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,41 (q,  $J = 7,1$  Hz, 4H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,91-2,79 (m, 2H, OCHCH<sub>2</sub>CCH), 2,11 (t,  $J = 2,6$  Hz, 1H, OCHCH<sub>2</sub>CCH), 1,21 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

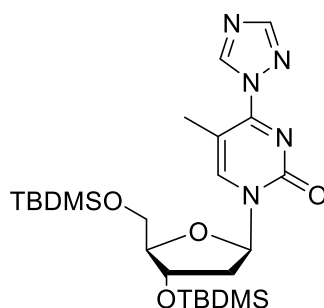
$^{13}\text{C}$ -NMR (125,77 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 165,6, 161,2, 156,5, 2 \times 150,6, 131,5, 129,8, 128,5, 128,4, 127,0, 124,4, 123,1$  (q,  $J = 289$  Hz), 108,8, 106,3, 105,0, 98,0, 84,5 (q,  $J = 28$  Hz), 78,1, 72,1, 71,4, 2  $\times$  56,0, 53,4, 44,8, 30,9, 29,6, 25,0, 12,4 ppm.

$^{19}\text{F}$ -NMR (470,64 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = -71,3$  ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{NO}_5$   $[\text{M}+\text{H}^+]^+$  502,18358, gefunden 502,18307  
( $\Delta m = 0,00051$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 1,0$  ppm)

#### 4.2.3 Synthese der Alkin-modifizierten photolabilen Phosphoramidit-Bausteine

**Synthese von 4-(1,2,4-Triazol-1-yl)-3'-5'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)-2'-desoxythymidin (64)**

**64**

$C_{24}H_{43}N_5O_4Si_2$   
521,81 g/mol

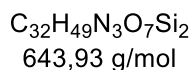
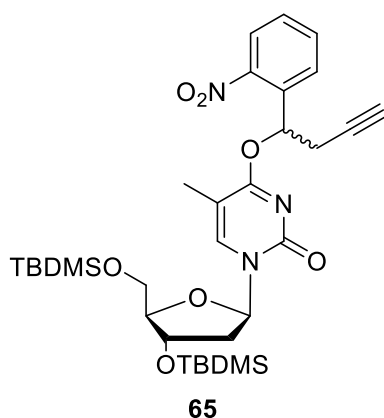
Die Synthese wurde gemäß einer Literaturvorschrift durchgeführt.<sup>[152]</sup> 1,2,4-Triazole (27,6 g, 400 mmol, 20 eq.) wurde in 300 ml abs. Acetonitril suspendiert. Die Suspension wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und dann langsam Phosphorylchlorid (9,5 ml, 100 mmol, 5 eq.) hinzugefügt. Unter starkem Rühren wurde anschließend Triethylamin (56 ml, 400 mmol, 20 eq.) hinzugegeben. Nach 15 Minuten Rühren wurde schließlich eine Lösung von 3'-5'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)-2'-desoxythymidin (9,42 g, 20 mmol, 1 eq.) in 120 ml abs. Acetonitril innerhalb von 30 Minuten hinzugefügt und das Reaktionsgemisch über Nacht weitergerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde hintereinander mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Kochsalz-Lösung gewaschen und dann über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und Verbindung **64** als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 10,75 g (20 mmol, quant.)

DC (Cyclohexan/Aceton 2:1):  $R_f = 0,45$

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 9,31$  (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 6,30 (t,  $J = 6,2$  Hz, 1H), 4,39-4,42 (m, 1H), 4,07-4,09 (m, 1H), 3,97 (dd,  $J = 11,6, 2,5$  Hz, 1H), 3,81 (dd,  $J = 11,6, 2,5$  Hz, 1H), 2,66 (ddd,  $J = 13,4, 6,1, 3,7$  Hz, 1H), 2,46 (s, 3H), 2,09 (dt,  $J = 13,2, 6,4$  Hz, 1H), 0,93 (s, 9H), 0,91 (s, 9H), 0,13 (s, 3H), 0,12 (s, 3H), 0,10 (s, 3H), 0,09 (s, 3H) ppm.

**Synthese von 3'-5'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-O<sup>4</sup>-[1-(2-nitrophenyl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxythymidin (65)**



NPBY-Alkohol **43** (191 mg, 1 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit Verbindung **64** (574 mg, 1,1 mmol, 1,1 eq.) in 5,5 ml abs. Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung wurde 1,8-Diazabicycloundec-7-en (DBU, 0,16 ml, 1,1 mmol, 1,1 eq.) hinzugefügt und die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand direkt säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 6:1 -> 4:1). Verbindung **65** wurde als Schaum isoliert.

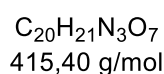
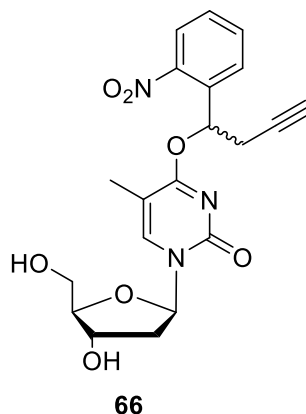
Ausbeute: 400 mg (0,62 mmol, 62%)

DC (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1):  $R_f = 0,6$

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 8,07-8,05$  (m, 1H, H<sub>ar.</sub>),  $7,80-7,78$  (m, 3H, 2x H<sub>ar.</sub>, 6-H),  $7,64-7,59$  (m, 1H, H<sub>ar.</sub>),  $6,59-6,54$  (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>),  $6,06-6,01$  (m, 1H, 1'-H),  $4,36-4,31$  (m, 1H, 3'-H),  $3,87-3,84$  (m, 1H, 4'-H),  $3,80-3,70$  (m, 2H, 2x 5'-H),  $3,03-2,99$  (m, 2H, OCHCH<sub>2</sub>),  $2,95-2,94$  (m, 1H, CCH),  $2,24-2,02$  (m, 2H, 2x 2'-H),  $2,00$  (s, 3H, CH<sub>3</sub>),  $0,87-0,85$  (m, 18H, 2x C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  $0,08-0,06$  (m, 12H, 2x Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $C_{32}H_{49}N_3O_7Si_2K$  [M+K]<sup>+</sup> 682,27406, gefunden 682,27333 ( $\Delta m = 0,00073$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 1,1$  ppm)



**Synthese von *O*<sup>4</sup>-[1-(2-nitrophenyl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxythymidin (**66**)**

Verbindung **65** (869 mg, 1,35 mmol, 1 eq.) wurde in 7 ml abs. THF gelöst und es wurde Essigsäure (0,93 ml, 16,2 mmol, 12 eq.) hinzugefügt. Die Lösung wurde mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt, woraufhin 1M Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung in THF (TBAF, 4,05 ml, 4,05 mmol, 3 eq.) hinzugegeben wurden. Das Reaktionsgemisch wurde einen Tag bei Raumtemperatur gerührt, dann das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand direkt säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 95:5). Das Produkt wurde als Schaum erhalten.

Ausbeute: 500 mg (1,20 mmol, 89%)

DC (DCM/MeOH 95:5):  $R_f = 0,2$

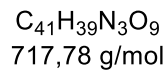
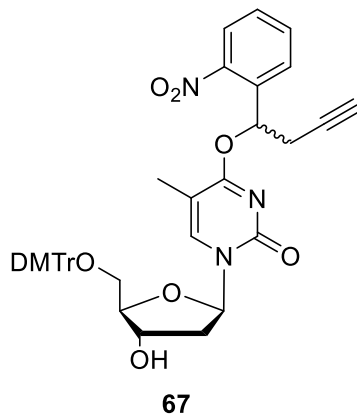
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 8.08-8.06$  (m, 1H, *H*<sub>ar.</sub>), 7.80-7.78 (m, 3H, 2x *H*<sub>ar.</sub>, 6-H), 7.63-7.61 (m, 1H, *H*<sub>ar.</sub>), 6.59-6.53 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>), 6.07-6.01 (m, 1H, 1'-H), 5.23-5.21 (m, 1H, 3'-OH), 5.06 (m, 1H, 5'-OH), 4.22-4.19 (m, 1H, 3'-H), 3.80-3.78 (m, 1H, 4'-H), 3.61-3.56 (m, 2H, 2x 5'-H), 3.03-2.99 (m, 2H, OCHCH<sub>2</sub>), 2.95 (m, 1H, CCH), 2.18-2.12 (m, 1H, 1x 2'-H), 2.02-1.92 (m, 4H, 1x CH<sub>3</sub>, 1x 2'-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125.77 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 2x 168.3, 154.0, 153.9, 147.5, 2x 142.0, 134.1, 2x 134.0, 2x 129.5, 128.2, 128.1, 124.6, 2x 102.7, 87.6, 85.7, 79.4, 79.3, 73.8, 73.7, 70.6, 70.4, 70.0, 69.9, 2x 60.9, 2x 60.9, 40.6, 40.5, 2x 25.0, 19.5, 13.6, 11.6$  ppm.

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M+K]<sup>+</sup> 454.10111, gefunden 454.10096

( $\Delta m = 0,00085$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 1,9$  ppm)

**Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O<sup>4</sup>-[1-(2-nitrophenyl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxythymidin (67)**



Verbindung **66** (500 mg, 1,2 mmol, 1 eq.) wurde dreimal mit je 15 ml abs. Pyridin koevaporiert und daraufhin in 25 ml abs. Pyridin gelöst. Anschließend wurde 4-4'-Dimethoxytritylchlorid (490 mg, 1,44 mmol, 1,2 eq.) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Ethanol beendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 30 ml DCM aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 5%-iger wässriger Zitronensäure-Lösung und daraufhin mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 100:1), wobei die das Kieselgel zu Beginn durch Zusatz von 0,5V-%  $NEt_3$  deaktiviert wurde. Verbindung **67** wurde als gelber Schaum isoliert.

**Ausbeute:** 693 mg (0,97 mmol, 81%)

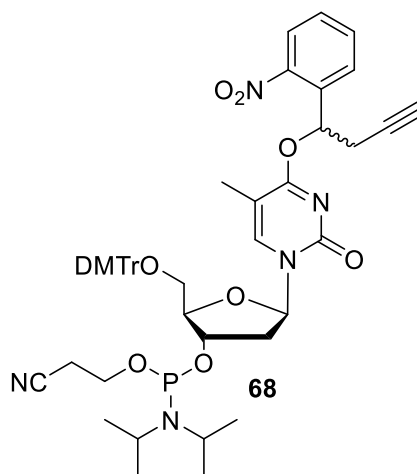
**DC** (DCM/MeOH 100:2):  $R_f = 0,3$

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 8,08-8,06$  (m, 1H,  $H_{ar.}$ ), 7,86 (s, 1H, 6-H), 7,81-7,77 (m, 2H, 2x  $H_{ar.}$ ), 7,65-7,59 (m, 1H,  $H_{ar.}$ ), 7,38-7,35 (m, 2H, DMT-  $H_{ar.}$ ), 7,32-7,21 (m, 7H, DMT- $H_{ar.}$ ), 6,90-6,89 (m, 4H, DMT- $H_{ar.}$ ), 6,60-6,54 (m, 1H,  $OCHCH_2$ ), 6,11-6,05 (m, 1H, 1'-H), 5,33-5,30 (m, 1H, 3'-OH), 4,30-4,24 (m, 1H, 3'-H), 3,93-3,90 (m, 1H, 4'-H), 3,76 (s, 6H, 2x DMT- $OCH_3$ ), 3,25-3,18 (m, 2H, 2x 5'-H), 3,05-2,98 (m, 2H,  $OCHCH_2$ ), 2,96-2,94 (m, 1H,  $CCH$ ), 2,27-2,20 (m, 1H, 1x 2'-H), 2,17-2,06 (m, 1H, 1x 2'-H), 1,65-1,64 (m, 3H,  $CH_3$ ) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (125,77 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 2x 168,3, 158,2, 153,9, 153,8, 147,6, 147,5, 2x 144,7, 141,4, 2x 135,4, 135,2, 2x 134,0, 133,9, 129,8, 129,7, 129,6, 129,5, 128,3, 128,1, 2x 127,9, 2x 127,6, 2x 126,8, 2x 124,6, 113,3, 2x 102,9, 2x 85,9, 2x 85,8, 85,6, 79,4, 79,3, 73,8, 73,7, 70,7, 70,5, 70,1, 70,0, 63,4, 63,3, 55,1, 45,7, 40,7, 40,6, 2x 25,0, 2x 11,2$  ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $C_{41}H_{39}N_3O_9$   $[M+Na]^+$  740.25785, gefunden 740.25865  
( $\Delta m = 0,00080$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 1,1$  ppm)

**Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O<sup>4</sup>-[1-(2-nitrophenyl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl)phosphoramidit (**68**)**



$C_{50}H_{56}N_5O_{10}P$   
918,00 g/mol

Verbindung **67** (215 mg, 0,3 mmol, 1 eq.) wurde in 9 ml abs. DCM gelöst. Nach Zugabe von *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA, 0,26 ml, 1,5 mmol, 5 eq.) wurde für 15 Minuten gerührt und daraufhin 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorphosphin (0,14 ml, 0,6 mmol, 2 eq.) hinzugefügt. Nach zwei Stunden wurde die Reaktion mit 15 ml einer 5%-igen wässrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung beendet. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer Säulenchromatographie aufgereinigt (Hexan/Ethylacetat 2:1 -> 1:1), wobei die das Kieselgel zu Beginn durch Zusatz von 0,5V-%  $NEt_3$  deaktiviert wurde. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 282 mg (0,3 mmol, quant.)

DC (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1):  $R_f = 0,5 + 0,45$  (Phosphor-Diastereomere)

$^1H$ -NMR (500, MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta = 8,08-8,06$  (m, 1H,  $H_{ar.}$ ), 7,89 (s, 1H, 6-H), 7,81-7,77 (m, 2H, 2x  $H_{ar.}$ ), 7,65-7,59 (m, 1H,  $H_{ar.}$ ), 7,38-7,35 (m, 2H, DMT- $H_{ar.}$ ), 7,32-7,21 (m, 7H, DMT-  $H_{ar.}$ ), 6,90-6,87 (m, 4H, DMT- $H_{ar.}$ ), 6,60-6,54 (m, 1H,  $OCHCH_2$ ), 6,10-6,05 (m, 1H, 1'-H), 4,55-4,46 (m, 1H, 3'-H), 4,10-4,07 (m, 1H, 4'-H), 3,74-3,73 (m, 6H, 2x DMT- $OCH_3$ ), 3,61-3,56 (m, 2H,  $NCCH_2CH_2O$ ), 3,56-3,50 (m, 2H,  $N(CH(CH_3)_2)_2$ ), 3,30-3,23 (m, 2H, 2x 5'-H), 3,05-2,98 (m, 2H,

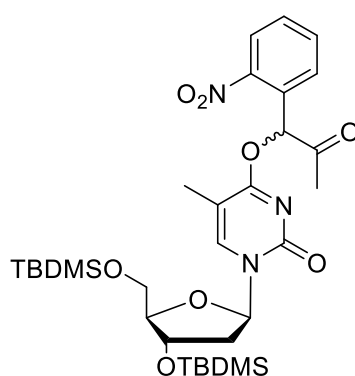
OCHCH<sub>2</sub>), 2,96-2,94 (m, 1H, CCH), 2,64-2,61 (m, 2H, NCCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2,40-2,20 (m, 2H, 2x 2'-H), 1,67-1,65 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,13-1,06 (m, 12H, N(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125,77 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 2x 168,3, 158,2, 153,9, 153,8, 147,6, 147,5, 2x 144,7, 141,4, 2x 135,4, 135,2, 2x 134,0, 133,9, 129,8, 129,7, 129,6, 129,5, 128,3, 128,1, 2x 127,9, 2x 127,6, 2x 126,8, 2x 124,6, 113,3, 2x 102,9, 2x 85,9, 2x 85,8, 85,6, 79,4, 79,3, 73,8, 73,7, 70,7, 70,5, 70,1, 70,0, 63,4, 63,3, 55,1, 54,9, 45,7, 40,7, 40,6, 2x 25,0, 2x 11,2 ppm.

<sup>31</sup>P-NMR (202,48 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 147,4, 147,3 ppm.

(Anmerkung: Die Phosphordiastereomere konnten durch säulenchromatographische Aufarbeitung getrennt werden, was aber nicht nötig ist. Die oben zusammengefassten spektroskopischen Daten beziehen sich auf das Diastereomer mit R<sub>f</sub> = 0,5.)

### Synthese von 3'-5'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-O<sup>4</sup>-[1-(2-nitrophenyl)-2-oxo-prop-1-yl]-2'-desoxythymidin (71)



71

C<sub>31</sub>H<sub>49</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>2</sub>  
647,92 g/mol

NPPY-Alkohol **42** (177 mg, 1 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit Verbindung **64** (574 mg, 1,1 mmol, 1,1 eq.) in 5,55 ml abs. Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung wurde 1,8-Diazabicycloundec-7-en (DBU, 0,16 ml, 1 mmol, 1 eq.) hinzugefügt und die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand direkt säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 6:1). Verbindung **65** wurde als Schaum isoliert.

Ausbeute: 229 mg (0,35 mmol, 35%)

DC (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1): R<sub>f</sub> = 0,5

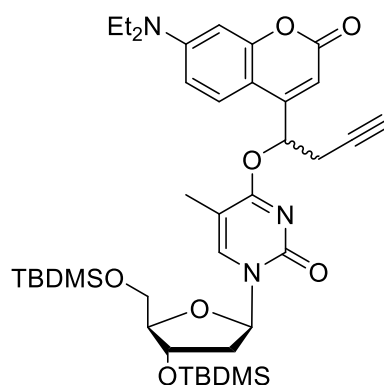
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8,16-8,15 (m, 1H, H<sub>ar.</sub>), 7,88-7,83 (m, 1H, H<sub>ar.</sub>), 7,75-7,71 (m, 1H, H<sub>ar.</sub>), 7,63-7,59 (m, 1H, H<sub>ar.</sub>), 7,49-7,47 (d, J = 1,0 Hz, 1H, H-6), 6,12-6,08 (m, 1H, 1'-

H), 5,89-5,844 (m, 1H, OCHCO), 4,36-4,32 (m, 1H, 3'-H), 3,83-3,80 (m, 1H, 4'-H), 3,76-3,68 (m, 2H, 2x 5'-H), 2,16-2,07 (m, 2H, 2x 2'-H), 1,78 (d,  $J = 1,0$  Hz, 3H, 5-CH<sub>3</sub>), 1,41-1,39 (m, 3H, CO-CH<sub>3</sub>), 0,88-0,86 (m, 18H, 2x C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,09-0,05 (m, 12H, 2x Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

**13C**

ESI-MS:  $m/z$  berechnet für C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 648,9, gefunden 648,9

**Synthese von 3'-5'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)-O<sup>4</sup>-[1-(7-(diethylamino)cumarin-4-yl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxythymidin (72)**

**72**

C<sub>39</sub>H<sub>59</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>Si<sub>2</sub>  
738,09 g/mol

DEACBY-Alkohol **56** (344 mg, 1,2 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit Verbindung **64** (689 mg, 1,32 mmol, 1,1 eq.) in 4,5 ml abs. Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung wurde 1,8-Diazabicycloundec-7-en (DBU, 0,2 ml, 1,32 mmol, 1,1 eq.) hinzugefügt und die Mischung für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand direkt säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 -> 2:1). Verbindung **72** wurde als gelber Schaum isoliert.

Ausbeute: 657 mg (0,89 mmol, 74%)

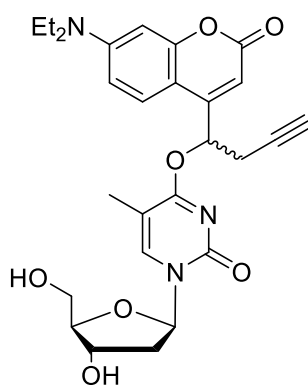
DC (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1):  $R_f = 0,6$

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 7,83$  (s, 1H, 6-H), 7,68-7,64 (m, 1H, DEACBY 5-H), 6,75-6,72 (m, 1H, DEACBY 6-H), 6,57-6,56 (m, 1H, DEACBY 8-H), 6,43-6,38 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>), 6,08-6,05 (m, 1H, 1'-H), 5,96-5,95 (m, 1H, DEACBY 3-H), 4,37-4,32 (m, 1H, 3'-H), 3,89-3,85 (m, 1H, 4'-H), 3,81-3,71 (m, 2H, 2x 5'-H), 3,44 (q,  $J = 7,1$  Hz, 4H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,04-2,96 (m, 2H, 1x OCHCH<sub>2</sub>, CCH), 2,92-2,86 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>), 2,24-2,17 (m, 1H, 1x 2'-H), 2,15-2,07 (m, 1H, 1x 2'-H), 2,02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,13 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,87-0,85 (m, 18H, 2x C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,08-0,06 (m, 12H, 2x Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 168,2, 160,6, 156,1, 154,0, 152,8, 152,6, 150,5, 141,6, 141,5, 2x 125,6, 109,0, 104,8, 102,9, 102,9, 102,8, 2x 97,1, 87,4, 87,3, 86,0, 85,8, 78,9, 74,3, 72,1, 71,9, 70,3, 70,2, 62,6, 62,5, 44,0, 40,5, 40,4, 4x 25,7, 24,3, 24,2, 20,8, 18,0, 17,9, 2x 17,7, 12,3, 2x 11,7, 2x -4,8, 2x -5,0, 2x -5,5 ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für C<sub>39</sub>H<sub>59</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 738,39643 gefunden 738,39713 (Δ*m* = 0,00070, relativer Fehler Δ*m*/*m* = 1,0 ppm)

### Synthese von *O*<sup>4</sup>-[1-(7-(Diethylamino)cumarin-4-yl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxythymidin (**73**)



**73**

C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>  
509,56 g/mol

Verbindung **72** (657 mg, 0,89 mmol, 1 eq.) wurde in 5 ml abs. THF gelöst und es wurde Essigsäure (0,61 ml, 10,7 mmol, 12 eq.) hinzugefügt. Die Lösung wurde mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt, woraufhin 1M Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung in THF (TBAF, 2,67 ml, 2,67 mmol, 3 eq.) hinzugegeben wurden. Das Reaktionsgemisch wurde einen Tag bei Raumtemperatur gerührt, dann das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand direkt säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 95:5). Das Produkt wurde als Schaum erhalten (geringfügige Verunreinigung durch TBAF).

**Ausbeute:** 440 mg (1,20 mmol, 86%)

**DC** (DCM/MeOH 9:1): R<sub>f</sub> = 0,45

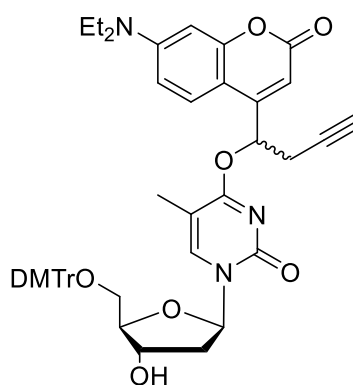
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8,14-8,12 (m, 1H, 6-H), 7,68-7,64 (m, 1H, DEACBY 5-H), 6,75-6,73 (m, 1H, DEACBY 6-H), 6,57-6,56 (m, 1H, DEACBY 8-H), 6,43-6,38 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>), 6,10-6,06 (m, 1H, 1'-H), 5,96-5,95 (m, 1H, DEACBY 3-H), 5,21-5,05 (m, 2H, 3'-OH, 5'-OH), 4,24-4,20 (m, 1H, 3'-H), 3,81-3,79 (m, 1H, 4'-H), 3,65-3,55 (m, 2H, 2x 5'-H), 3,44 (q, *J* = 7,0 Hz, 4H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,03-2,98 (m, 2H, 1x OCHCH<sub>2</sub>, CCH), 2,91-2,86 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>), 2,23-2,15 (m, 1H, 1x 2'-H), 2,05-1,97 (m, 4H, 1x 2'-H, CH<sub>3</sub>), 1,13 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (125,77 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 2x 168,1, 2x 160,6, 156,1, 154,1, 154,0, 152,9, 152,8, 150,5, 142,2, 2x 125,6, 109,0, 2x 104,8, 2x 104,7, 2x 102,8, 97,1, 87,7, 2x 85,7, 2x 78,9, 74,3, 2x 70,1, 70,0, 69,9, 61,0, 60,9, 44,0, 40,6, 40,5, 24,3, 24,2, 12,3, 11,7 ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M+K]<sup>+</sup> 548,17936, gefunden 548,17932

(Δ*m* = 0,00004, relativer Fehler Δ*m/m* = 0,1 ppm)

**Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O<sup>4</sup>-[1-(7-(diethylamino)cumarin-4-yl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxythymidin (74)**



**74**

C<sub>48</sub>H<sub>49</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>  
811,93 g/mol

Verbindung **73** (440 mg, 0,8 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit 4-4'-Dimethoxytritylchlorid (327 mg, 0,96 mmol, 1,2 eq.) bei 0 °C in 17 ml abs. Pyridin gelöst. Das Reaktionsgemisch für auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Ethanol beendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 30 ml DCM aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 30 ml 5%-iger wässriger Zitronensäure-Lösung und daraufhin mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 95:5), wobei das Kieselgel zu Beginn durch Zusatz von 0,5V-% NEt<sub>3</sub> deaktiviert wurde. Verbindung **74** wurde als gelber Schaum isoliert.

**Ausbeute:** 552 mg (0,68 mmol, 85%)

**DC** (DCM/MeOH 92:8): R<sub>f</sub> = 0,55

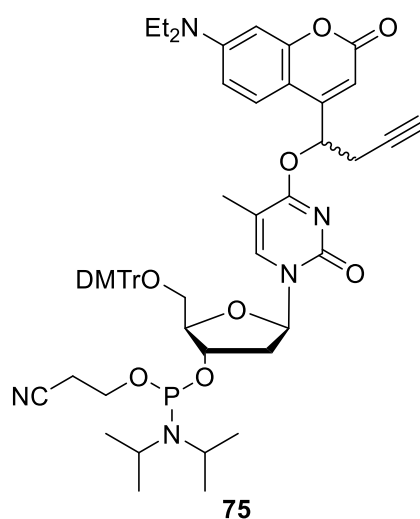
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7,91 (m, 1H, 6-H), 7,68-7,64 (m, 1H, DEACBY 5-H), 7,39-7,37 (m, 2H, DMT-H<sub>ar</sub>), 7,33-7,28 (m, 2H, DMT-H<sub>ar</sub>), 7,22-7,27 (m, 5H, DMT-H<sub>ar</sub>), 6,91-6,89 (m, 4H, DMT-H<sub>ar</sub>), 6,76-6,73 (m, 1H, DEACBY 6-H), 6,58-6,56 (m, 1H, DEACBY 8-H), 6,44-6,38 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>), 6,14-6,09 (m, 1H, 1'-H), 5,95 (s, 1H, DEACBY 3-H), 5,34-5,31 (m, 1H,

3'-OH), 4,33-4,27 (m, 1H, 3'-H), 3,94-3,92 (m, 1H, 4'-H), 3,74 (s, 6H, 2x OCH<sub>3</sub>), 3,47-3,42 (m, 4H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,27-3,19 (m, 2H, 2x 5'-H), 3,03-2,97 (m, 2H, 1x OCHCH<sub>2</sub>, CCH), 2,91-2,86 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>), 2,31-2,22 (m, 1H, 1x 2'-H), 2,19-2,11 (m, 1H, 2'-H), 1,68-1,66 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,15-1,11 (m, 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125,77 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 2x 168,0, 2x 160,4, 2x 158,0, 2x 155,9, 2x 153,8, 152,6, 152,5, 2x 150,3, 144,6, 144,5, 141,4, 141,3, 135,3, 135,2, 135,0, 2x 129,6, 2x 127,8, 127,5, 126,6, 125,5, 125,4, 113,1, 108,8, 104,7, 2x 102,8, 96,9, 85,8, 85,7, 2x 85,6, 2x 85,5, 78,8, 78,7, 2x 74,1, 70,1, 70,0, 2x 69,9, 2x 63,2, 54,9, 45,6, 43,9, 40,6, 40,4, 24,2, 24,1, 13,9, 12,2, 2x 11,1 ppm.

ESI-MS: *m/z* berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 812,4 gefunden 812,4

### Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O<sup>4</sup>-[1-(7-(diethylamino)cumarin-4-yl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl)phos-phoramidit (**75**)



C<sub>57</sub>H<sub>66</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>P  
1012,15 g/mol

Verbindung **74** (203 mg, 0,25 mmol, 1 eq.) wurde in 8 ml abs. DCM gelöst. Nach Zugabe von *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA, 0,22 ml, 1,25 mmol, 5 eq.) wurde für 15 Minuten gerührt und daraufhin 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorphosphin (0,12 ml, 0,5 mmol, 2 eq.) hinzugefügt. Nach zwei Stunden wurde die Reaktion mit 15 ml einer 5%-igen wässrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung beendet. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer Säulenchromatographie aufgereinigt (Hexan/Aceton 2:1 -> 4:3), wobei das Kieselgel zu Beginn durch Zusatz von 0,5V-% NEt<sub>3</sub> deaktiviert wurde. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.



Ausbeute: 244 mg (0,24 mmol, 96%)

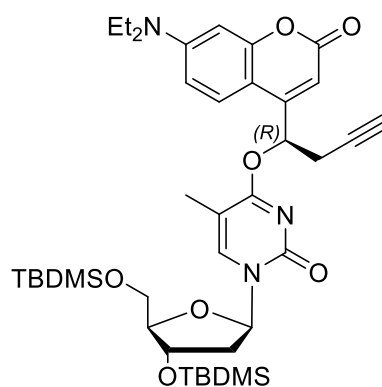
DC (Hexan/Aceton 1:1):  $R_f = 0,7$

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 7,94\text{-}7,92$  (m, 1H, 6-H), 7,68-7,64 (m, 1H, DEACBY 5-H), 7,39-7,36 (m, 2H, DMT- $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7,32-7,22 (m, 7H, DMT- $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6,91-6,87 (m, 4H, DMT- $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6,74-6,73 (m, 1H, DEACBY 6-H), 6,57-6,56 (m, 1H, DEACBY 8-H), 6,44-6,38 (m, 1H,  $\text{OCHCH}_2$ ), 6,16-6,07 (m, 1H, 1'-H), 5,95 (m, 1H, DEACBY 3-H), 4,55-4,49 (m, 1H, 3'-H), 4,10-4,04 (m, 1H, 4'-H), 3,74-3,73 (m, 6H, 2x  $\text{OCH}_3$ ), 3,72-3,46 (m, 4H,  $\text{NCCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2$ ), 3,46-3,42 (m, 4H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 3,30-3,26 (m, 2H, 2x 5'-H), 3,02-2,97 (m, 2H, 1x  $\text{OCHCH}_2$ ,  $\text{CCH}$ ), 2,91-2,87 (m, 1H,  $\text{OCHCH}_2$ ), 2,76-2,62 (m, 2H,  $\text{NCCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 2,41-2,29 (m, 2H, 2x 2'-H), 1,71-1,67 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,14-0,95 (m, 18H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2$ ) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (125,77 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 2 \times 168,3$ , 2x 160,6, 158,2, 156,1, 2x 153,9, 2x 152,7, 152,6, 150,5, 2x 144,6, 141,8, 141,7, 141,6, 141,5, 2x 135,3, 2x 135,1, 135,0, 2x 129,8, 3x 129,7, 3x 127,9, 2x 127,6, 126,9, 2x 126,8, 2x 125,6, 119,0, 118,9, 2x 118,8, 113,3, 109,0, 104,9, 2x 104,8, 103,2, 2x 103,1, 103,0, 97,1, 3x 86,0, 85,9, 2x 85,8, 2x 85,7, 84,8, 84,5, 3x 78,9, 74,3, 72,7, 72,5, 72,1, 72,0, 70,3, 70,2, 62,9, 62,6, 58,4, 3x 58,3, 2x 58,2, 55,1, 45,7, 44,0, 42,6, 42,5, 31,0, 24,4, 2x 24,3, 4x 24,2, 24,1, 22,1, 4x 19,8, 19,7, 14,0, 12,3, 11,3, 11,2 ppm.

$^{31}\text{P NMR}$  (202,48 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 147,6$ , 2x 147,3 ppm.

### Synthese von 3'-5'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-O<sup>4</sup>-[(1*R*)-(7-(diethylamino)cumarin-4-yl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxythymidin ((*R*)-72)



**(*R*)-72**

$\text{C}_{39}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_7\text{Si}_2$   
738,09 g/mol

Die Synthese von Verbindung (*R*)-72 erfolgte nach der Prozedur für das Diastereomerenmisch 72 mit dem enantiomeren-reinen DEACBY-Alkohol (*R*)-56.

Ausbeute: 639 mg (0,87 mmol, 72%)

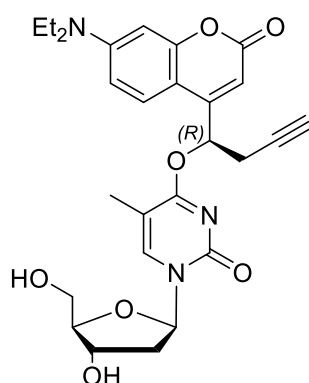
DC (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1):  $R_f = 0,75$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 7,83$  (s, 1H, 6-H), 7,65 (d,  $J = 9,1$  Hz, 1H, DEACBY 5-H), 6,74 (d,  $J = 9,1$  Hz, 1H, DEACBY 6-H), 6,56 (s, 1H, DEACBY 8-H), 6,39 (t,  $J = 5,3$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2$ ), 6,06 (t,  $J = 6,4$  Hz, 1H, 1'-H), 5,96 (s, 1H, DEACBY 3-H), 4,38-4,34 (m, 1H, 3'-H), 3,87-3,85 (m, 1H, 4'-H), 3,80-3,71 (m, 2H, 2x 5'-H), 3,44 (q,  $J = 6,4$  Hz, 4H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 3,03-2,96 (m, 2H, 1x  $\text{OCHCH}_2$ , CCH), 2,91-2,86 (m, 1H,  $\text{OCHCH}_2$ ), 2,26-2,19 (m, 1H, 1x 2'-H), 2,16-2,10 (m, 1H, 1x 2'-H), 2,02 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,13 (t,  $J = 6,8$  Hz, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 0,87-0,85 (m, 18H, 2x  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0,08-0,06 (m, 12H, 2x  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125,77 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 168,2$ , 160,6, 156,1, 154,0, 152,7, 150,5, 141,5, 125,6, 109,0, 104,8, 102,9, 97,1, 87,3, 86,0, 85,8, 78,9, 74,3, 71,9, 70,3, 62,5, 44,0, 40,4, 2x 25,7, 24,2, 20,8, 18,0, 17,7, 12,3, 11,7, -4,8, -5,0, -5,5 ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{39}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_7\text{Si}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  738,39643 gefunden 738,39713 ( $\Delta m = 0,0007$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 1,0$  ppm)

### Synthese von ***O***<sup>4</sup>-[(1*R*)-(7-(Diethylamino)cumarin-4-yl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxythymidin (**(*R*)-73**)



**(*R*)-73**

$\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7$   
509,56 g/mol

Die Synthese von Verbindung (***R***)-73 erfolgte nach der Prozedur für das Diastereomergemisch **73** ausgehend von Verbindung (***R***)-72.

Ausbeute: 433 mg (0,85 mmol, 99%)

DC (Dichlormethan/Methanol 9:1):  $R_f = 0,45$

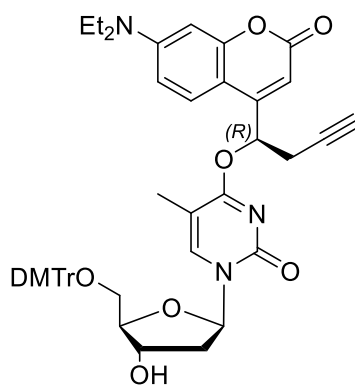
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 8,13$  (s, 1H, 6-H), 7,65 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H, DEACBY 5-H), 6,74 (dd,  $J = 9,2$ , 2,4 Hz, 1H, DEACBY 6-H), 6,57 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H, DEACBY 8-H), 6,39 (t,  $J = 5,4$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2$ ), 6,07 (t,  $J = 6,4$  Hz, 1H, 1'-H), 5,95 (s, 1H, DEACBY 3-H), 5,22 (d,  $J =$

4,4 Hz, 1H, 3'-OH), 5,07 (t,  $J = 5,2$  Hz, 1H, 5'-OH), 4,24-4,22 (dtd,  $J = 4,4, 4, 3,5$  Hz, 1H, 3'-H), 3,80 (q,  $J = 3,5$  Hz, 1H, 4'-H), 3,63 (ddd,  $J = 12,0, 5,2, 3,5$  Hz, 1H, 1x 5'-H), 3,56 (ddd,  $J = 12,0, 5,2, 3,5$  Hz, 1H, 1x 5'-H), 3,44 (q,  $J = 6,9$  Hz, 4H,  $N(CH_2CH_3)_2$ ), 3,03-2,98 (m, 2H, 1x  $OCHCH_2$ , CCH), 2,89 (ddd,  $J = 17,5, 5,2, 2,6$  Hz, 1H,  $OCHCH_2$ ), 2,20 (ddd,  $J = 13,5, 6,0, 4,0$  Hz, 1H, 1x 2'-H), 2,05-1,97 (m, 4H, 1x 2'-H,  $CH_3$ ), 1,13 (t,  $J = 7,0$  Hz, 6H,  $N(CH_2CH_3)_2$ ) ppm.  
 $^{13}C$  NMR (125,77 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 168,1, 160,6, 156,1, 154,1, 152,8, 150,5, 142,2, 125,5, 109,0, 2x 104,8, 102,8, 97,1, 87,7, 85,7, 78,9, 74,3, 70,1, 69,9, 60,9, 44,0, 40,6, 24,2, 12,3, 11,7$  ppm.

**MALDI-HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $C_{27}H_{31}N_3O_7$   $[M+K]^+$  509,21620, gefunden 509,21325

( $\Delta m = 0,00295$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 5,8$  ppm)

### Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O<sup>4</sup>-[(1R)-(7-(diethylamino)cumarin-4-yl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxythymidin ((R)-74)



**(R)-74**

$C_{48}H_{49}N_3O_9$   
811,93 g/mol

Die Synthese von Verbindung (R)-74 erfolgte nach der Prozedur für das Diastereomergemisch **74** ausgehend von Verbindung (R)-73.

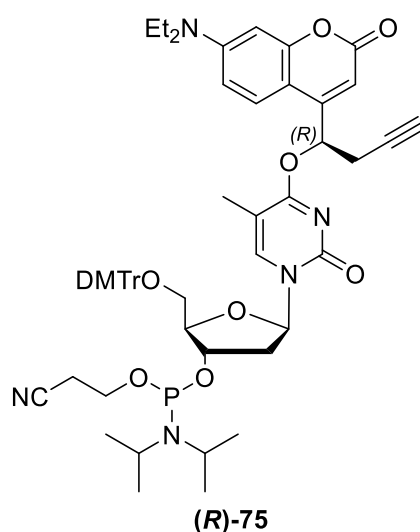
**Ausbeute:** 430 mg (63%)

**DC** (Dichlormethan/Methanol 92:8):  $R_f = 0,55$

**$^1H$ -NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 7,91$  (s, 1H, 6-H), 7,65 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H, DEACBY 5-H), 7,39-7,37 (m, 2H, DMT- $H_{ar.}$ ), 7,33-7,30 (m, 2H, DMT- $H_{ar.}$ ), 7,25-7,27 (m, 5H, DMT- $H_{ar.}$ ), 6,91-6,90 (m, 4H, DMT- $H_{ar.}$ ), 6,74 (dd,  $J = 9,2, 2,4$  Hz, 1H, DEACBY 6-H), 6,57 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H, DEACBY 8-H), 6,39 (t,  $J = 5,4$  Hz, 1H,  $OCHCH_2$ ), 6,10 (t,  $J = 6,3$  Hz 1H, 1'-H), 5,95 (s, 1H, DEACBY 3-H), 5,33 (d,  $J = 4,6$  Hz, 1H, 3'-OH), 4,33-4,29 (m, 1H, 3'-H), 3,93 (q,  $J = 3,9$  Hz, 1H, 4'-H), 3,74 (s, 6H, 2x  $OCH_3$ ), 3,47-3,46 (q,  $J = 6,9$  Hz, 4H,  $N(CH_2CH_3)_2$ ), 3,27-3,19 (m, 2H,

2x 5'-H), 3,03-2,98 (m, 2H, 1x OCHCH<sub>2</sub>, CCH), 2,91-2,86 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>), 2,31-2,26 (m, 1H, 1x 2'-H), 2,19-2,13 (m, 1H, 2'-H), 1,66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,13 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.  
<sup>13</sup>C-NMR (125,77 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 168,2, 160,6, 2x 158,2, 156,1, 153,9, 152,7, 150,5, 144,7, 141,5, 135,4, 135,2, 2x 129,7, 127,9, 127,6, 126,8, 125,5, 113,3, 109,0, 104,8, 103,0, 97,1, 85,9, 85,8, 85,7, 78,9, 74,3, 70,3, 70,0, 63,3, 55,1, 45,7, 44,0, 40,7, 24,2, 14,1, 12,3, 11,2 ppm.

**Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O<sup>4</sup>-[(1*R*)-(7-(diethylamino)cumarin-4-yl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl)phosphoramidit ((*R*)-75)**



C<sub>57</sub>H<sub>66</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>P  
1012,15 g/mol

Die Synthese von Verbindung (*R*)-75 erfolgte nach der Prozedur für das Diastereomergemisch 75 ausgehend von Verbindung (*R*)-74.

Ausbeute: 91 mg (0,089 mmol, 90%)

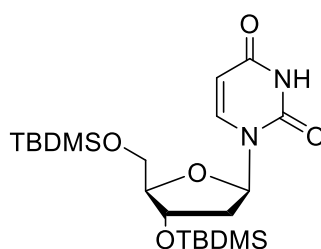
DC (Hexan/Aceton 1:1): R<sub>f</sub> = 0.70

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7,94-7,92 (m, 1H, 6-H), 7,66-7,64 (m, 1H, DEACBY 5-H), 7,39-7,37 (m, 2H, DMT-H<sub>ar</sub>), 7,32-7,23 (m, 7H, DMT-H<sub>ar</sub>), 6,91-6,87 (m, 4H, DMT-H<sub>ar</sub>), 6,75-6,73 (m, 1H, DEACBY 6-H), 6,57-6,56 (m, 1H, DEACBY 8-H), 6,41-6,38 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>), 6,13-6,08 (m, 1H, 1'-H), 5,95-5,96 (m, 1H, DEACBY 3-H), 4,57-4,50 (m, 1H, 3'-H), 4,11-4,03 (m, 1H, 4'-H), 3,74-3,73 (m, 6H, 2x OCH<sub>3</sub>), 3,70-3,48 (m, 4H, NCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, N(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 3,46-3,42 (q, *J* = 7,0 Hz, 4H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,30-3,26 (m, 2H, 2x 5'-H), 3,04-2,97 (m, 2H, 1x OCHCH<sub>2</sub>, CCH), 2,92-2,86 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>), 2,77-2,62 (m, 2H, NCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 2,40-2,29 (m, 2H, 2x 2'-H), 1,70-1,67 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,14-0,97 (m, 18H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

$^{13}\text{C}$ -NMR (125,77 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 168,2, 160,6, 158,2, 156,0, 153,9, 2x 152,7, 150,4, 144,6, 135,3, 2x 135,1, 2x 129,7, 2x 127,9, 2x 127,6, 126,9, 126,8, 125,5, 118,9, 118,8, 113,3, 109,0, 2x 104,8, 103,2, 103,1, 97,1, 2x 86,0, 2x 85,8, 84,8, 78,9, 74,3, 70,3, 62,6, 58,4, 58,3, 2x 58,2, 55,1, 44,0, 42,6, 42,5, 24,4, 2x 24,3, 2x 24,2, 24,1, 22,6, 2x 19,8, 19,7, 12,3, 11,2 ppm.

$^{31}\text{P}$ -NMR (202,48 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 147,6, 147,3 ppm.

### Synthese von 3'-5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyuridin (77)



77

$\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}_2$   
456,73 g/mol

2'-Desoxyuridin (9,128 g, 40 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (25 g, 166 mmol, 4,1 eq.) und Imidazol (19,8 g, 291 mmol, 7,3 eq.) unter Argon in 200 ml abs. DMF gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde für 72 Stunden gerührt und dann mit 100 ml Ethanol versetzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 150 ml Ethylacetat aufgenommen. Es wurde konsekutiv mit 150 ml dest. Wasser, 1M HCl-Lösung, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde als farbloser Schaum erhalten.

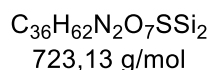
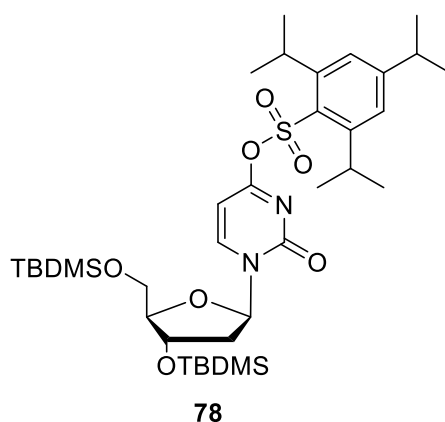
Ausbeute: 21,03 g (quantitative Umsetzung)

DC (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1):  $R_f$  = 0.75

$^1\text{H}$ -NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 11,32 (s, 1H, NH), 7,69 (d,  $J$  = 8,1 Hz, 1H, 6-H), 6,12 (t,  $J$  = 6,5 Hz, 1H, 1'-H), 5,58 (dd,  $J$  = 8,1, 1,7 Hz, 5-H), 4,39-4,34 (m, 1H, 3'-H), 3,81-3,64 (m, 3H, 4'-H, 2x5'-H), 2,25-2,05 (m, 2H, 2'-H), 0,88-0,82 (m, 18H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0,08-(-)0,06 (m, 12H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}_2$   $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$  479,23625, gefunden 479,23566 ( $\Delta m$  = 0,00059, relativer Fehler  $\Delta m/m$  = 1,2 ppm)

### Synthese von 3'-5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-O<sup>4</sup>-(2,4,6-triisopropylbenzylsulfonyl)-2'-desoxyuridin (78)



Verbindung **77** (9,134 g, 20 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP, 0,244 g, 2 mmol, 0,1 eq.) unter Argon in 200 ml abs. DCM gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Daraufhin wurde zuerst Diisopropylethylamin (DIPEA, 17 ml, 100 mmol, 5 eq.) und schließlich Triisopropylbenzylsulfonylchlorid (TIPSCI, 10,9 g, 36 mmol, 1,8 eq.) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für 15 Minuten bei 0 °C und dann für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung beendet und das Gemisch wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1).

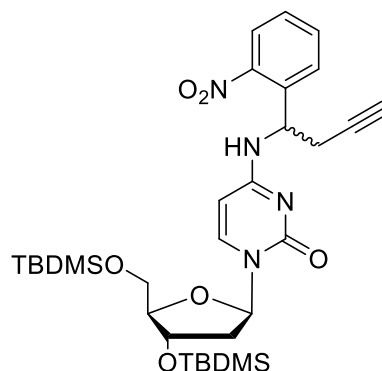
Ausbeute: 14,50 g (18 mmol, 92%)

DC (Cyclohexan/Ethylacetat 3:2):  $R_f = 0.9$

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>):  $\delta = 8,48$  (d,  $J = 7,3$  Hz, 1H, 6-H), 7,37 (s, 1H, *meta*-H<sub>ar.</sub>), 6,15 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1H, 5-H), 6,05 (t,  $J = 5,9$  Hz, 1H, 1'-H), 4,53-4,49 (ddd,  $J = 5,8, 4,8, 4,4$  Hz, 1H, 3'-H), 4,34-4,25 (spt,  $J = 6,8$  Hz, 2H, *ortho*-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,25-4,16 (sept,  $J = 6,8$  Hz, 1H, *para*-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,02-3,99 (m, 1H, 4'-H), 3,98-3,86 (m, 2H, 2x 5'-H), 2,44 (ddd,  $J = 13,4, 6,4, 4,9$  Hz, 2'-H), 2,22 (dt,  $J = 13,4, 5,8$ , 2'-H), 1,33-1,26 (m, 18H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,92 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,89 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,13-0,10 (m, 12H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>62</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>SSi<sub>2</sub> [M+K]<sup>+</sup> 723,34423, gefunden 723,34479 ( $\Delta m = 0,00056$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 0,8$  ppm)

### Synthese von 3'-5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*'-[1-(2-nitrophenyl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxycytidin (**79**)

**79**

$C_{31}H_{48}N_4O_6Si_2$   
628,92 g/mol

Verbindung **78** (1,504 g, 2,08 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit NPBY-Amin **50** (0,475 g, 2,5 mmol, 1,2 eq.) unter Argon in 22 ml abs. DMF vorgelegt. Hierzu wurde Diisopropylethylamin (DIPEA, 0,71 ml, 4,16 mmol, 2 eq.) gegeben und die Reaktionslösung unter Rühren für 7 Stunden auf 90 °C, 13 Stunden bei Raumtemperatur und schließlich 7 Stunden bei 100 °C erwärmt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 ml Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Trockenmittel abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (1x Dichlormethan/Methanol 20:1, dann Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 -> 1:1).

Ausbeute: 430 mg (0,68 mmol, 33%)

DC (DCM/MeOH 15:1):  $R_f = 0.4$

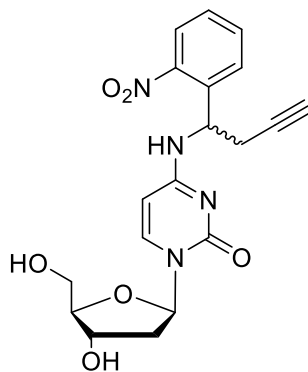
$^1H$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 8,48$  (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H, NH), 7,99-7,95 (m, 1H,  $H_{ar.}$ ), 7,77-7,67 (m, 3H, 6-H + 2 $\times H_{ar.}$ ), 7,57-7,53 (m, 1H,  $H_{ar.}$ ), 6,07-6,02 (2xt,  $J = 6,3$  Hz, 1H, 1'-H), 5,86 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H, 5-H), 5,69-5,62 (m, 1H, NCHCH<sub>2</sub>), 4,35-4,30 (m, 1H, 3'-H), 3,79-3,74 (m, 2H, 4'-H + 5'H), 3,69-3,66 (m, 1H, 5'-H), 2,95-2,93 (m, 1H, CCH), 2,80-2,68 (m, 2H, NCHCH<sub>2</sub>), 2,16-1,96 (m, 2H, 2'-H), 0,89 (2x s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,86 (2x s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,07-0,04 (m, 12H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

$^{13}C$ -NMR (124,19 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 163,2, 162,8, 2\times 154,9, 2\times 148,8, 140,7, 140,6, 137,0, 136,9, 2\times 134,2, 129,3, 128,8, 128,7, 124,9, 124,8, 94,7, 94,6, 87,0, 86,9, 85,3, 85,2, 81,2, 81,1, 73,9, 71,7, 71,5, 62,7, 62,6, 60,2, 55,4, 49,0, 48,7, 40,9, 40,8, 36,3, 31,2, 26,2, 2\times 26,1, 25,4, 25,3, 18,4, 16,2, 16,1, 14,6, 2\times 4,3, 2\times 4,5, -5,1, -5,2$  ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $C_{31}H_{48}N_4O_6Si_2$  [M+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup> 651,29991, gefunden 651,29984

( $\Delta m = 0,00007$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 0,1$  ppm)

### Synthese von *N*<sup>4</sup>-[1-(2-nitrophenyl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxycytidin (**80**)



**80**

$C_{19}H_{20}N_4O_6$   
400,39 g/mol

Verbindung **79** (428 mg, 0,68 mmol, 1 eq.) wurde in 4 ml abs. THF gelöst und mit Essigsäure (0,47 ml, 8,16 mmol, 12 eq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und dann TBAF (1M in THF, 2,04 ml, 2,04 mmol, 3 eq.) hinzugefügt. Es wurde für 70 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt, daraufhin das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand direkt säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol 10:1). Verbindung **80** wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 280 mg (quantitative Umsetzung)

DC (DCM/MeOH 9:1):  $R_f = 0.25$

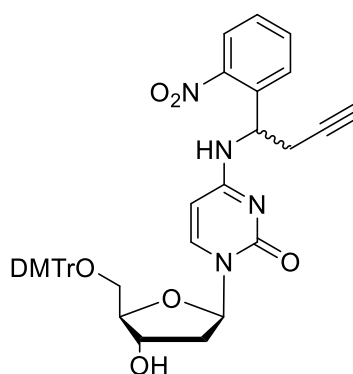
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 8,45$  (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H, NH), 7,99-7,96 (m, 1H, H<sub>ar.</sub>), 7,80-7,68 (m, 3H, 6-H + 2xH<sub>ar.</sub>), 7,57-7,53 (m, 1H, H<sub>ar.</sub>), 6,10-6,04 (m, 1H, 1'-H), 5,86 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H, 5-H), 5,69-5,63 (m, 1H, NCHCH<sub>2</sub>), 5,16 (t,  $J = 4,2$  Hz, 1H, 3'-OH), 4,95-4,90 (m, 1H, 5'-OH), 4,20-4,13 (m, 1H, 3'-H), 3,77-3,73 (m, 1H, 4'-H), 3,55-3,50 (m, 2H, 2x5'-H), 2,95-2,92 (m, 1H, CCH), 2,80-2,70 (m, 2H, NCHCH<sub>2</sub>), 2,16-1,90 (m, 2H, 2'-H) ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $C_{19}H_{20}N_4O_6$   $[M+K]^+$  439,10089, gefunden 439,10058

( $\Delta m = 0,00031$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 0,7$  ppm)



**Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N<sup>4</sup>-[1-(2-nitrophenyl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxycytidin (81)**



81

$C_{40}H_{38}N_4O_8$   
702,76 g/mol

Verbindung **80** (260 mg, 0,65 mmol, 1 eq.) wurde zweimal mit je 10 ml abs. Pyridin koevaporiert und dann in 15 ml abs. Pyridin gelöst. Zu dieser Lösung wurde bei 0 °C Dimethoxytritylchlorid (264 mg, 0,78 mmol, 1,2 eq.) gegeben und das Gemisch für 21 Stunden gerührt. Da nach dieser Zeit noch keine vollständige Reaktion eingetreten war, wurden weitere 0,4 eq. Dimethoxytritylchlorid hinzugefügt und die Reaktionslösung für weitere 23 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Ethanol beendet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 35 ml Dichlormethan aufgenommen. Es wurde einmal mit 20 ml 5%-iger Zitronensäure und einmal mit 20 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und nach Filtration des Trockenmittels das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol 100:3 -> 100:5), wobei das Kieselgel zu Beginn durch Zusatz von 0,5V-% NEt<sub>3</sub> deaktiviert wurde. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 167 mg (0,24 mmol, 37%)

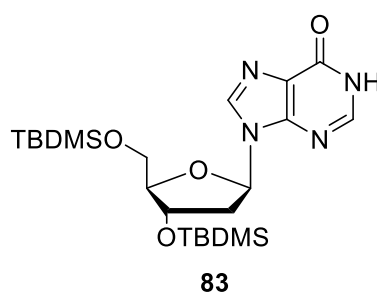
DC (DCM/MeOH 10:1): R<sub>f</sub> = 0.45

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8,49-8,47 (m, 1H, NH), 8,00-7,98 (m, 1H, H<sub>ar.</sub>), 7,80-7,64 (m, 3H, 6-H + 2xH<sub>ar.</sub>), 7,58-7,53 (m, 1H, H<sub>ar.</sub>), 7,38-7,36 (m, 2H, DMTr-H<sub>ar.</sub>), 7,33-7,29 (m, 2H, DMTr-H<sub>ar.</sub>), 7,27-7,22 (m, 5H, DMTr-H<sub>ar.</sub>), 6,91-6,89 (m, 4H, DMTr-H<sub>ar.</sub>), 6,10-6,06 (2xt, J = 6,5 Hz, 1H, 1'-H), 5,71 (pt, J = 7,6 Hz, 1H, 5-H), 5,69-5,63 (m, 1H, NCHCH<sub>2</sub>), 5,29-5,26 (m, 1H, 3'-OH), 4,27-4,18 (m, 1H, 3'-H), 3,87-3,83 (m, 1H, 4'-H), 3,75 (s, 6H, -OCH<sub>3</sub>), 3,22-3,15 (m, 2H, 2x5'-H), 2,97-2,93 (2xt, J = 2,5 Hz, 1H, CCH), 2,81-2,70 (m, 2H, NCHCH<sub>2</sub>), 2,20-2,11 (m, 1H, 2'-H), 2,06-1,94 (m, 1H, 2'-H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (125,77 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 162,7, 158,1, 2x154,4, 2x 148,3, 2x144,7, 140,3, 136,5, 136,4, 135,4, 135,2, 133,7, 129,7, 128,8, 128,7, 128,3, 128,1, 127,8, 127,7, 126,7, 124,4, 113,2, 94,1, 85,7, 2x 85,2, 84,8, 84,7, 80,7, 80,6, 73,4, 69,9, 69,8, 63,3, 55,0, 54,9, 48,5, 48,3, 45,7, 40,5, 40,4, 24,9, 24,8 ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für C<sub>40</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> [M+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup> 725,25764, gefunden 725,25716 (Δ*m* = 0,00048, relativer Fehler Δ*m/m* = 0,7 ppm)

### Synthese von 3'-5'-Bis-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyinosin (83)



C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub>  
480,76 g/mol

Die Synthese erfolgte gemäß einer Literaturvorschrift.<sup>[153]</sup> 2'-Desoxyinosin (5,045 g, 20 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl, 12,06 g, 80 mmol, 4 eq.) und Imidazol (9,53 g, 140 mmol, 7 eq.) unter Argon in 100 ml abs. DMF gelöst und für drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Da keine vollständige Reaktion abgelaufen war, wurden zwei weitere Äquivalente TBDMS-Cl hinzugefügt und für weitere 24 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 ml Ethanol beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 300 ml Ethylacetat aufgenommen und daraufhin mit je 300 ml dest. Wasser, 1M HCl-Lösung und ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde als Schaum erhalten und ohne weitere Aufreinigung für die folgenden Syntheseschritte verwendet.

**Ausbeute:** 5,55 g (11,54 mmol, 58%)

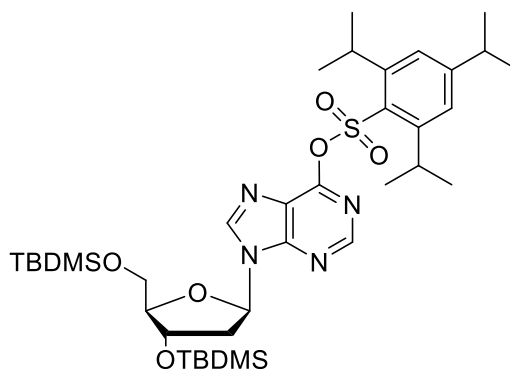
**DC** (DCM/MeOH 9:1): R<sub>f</sub> = 0.45

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 12,36 (bs, 1H, NH), 8,25 (s, 1H, 2-H), 8,04 (s, 1H, 8-H), 6,29 (t, J = 6,6 Hz, 1H, 1'-H), 4,58 (dt, J = 5,5, 3,5 Hz, 1H, 3'-H), 3,87-3,84 (m, 1H, 4'-H), 3,78-3,74 (m, 1H, 5'-H), 3,67-3,64 (m, 1H, 5'-H), 2,82 (m, 1H, 2'-H), 2,33 (ddd, J = 13,3, 6,4, 3,9 Hz, 1H, 2'-H), 0,89 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,85 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,11-0,01 (m, 12H, (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

**MALDI-HRMS:** *m/z* berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub> [M+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup> 481,26608, gefunden 481,26537

( $\Delta m = 0,00071$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 1,5$  ppm)

### Synthese von 3'-5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-O<sup>6</sup>-(2,4,6-triisopropylbenzylsulfonyl)-2'-desoxyinosin (**84**)



**84**

$C_{37}H_{62}N_4O_6SSi_2$   
747,16 g/mol

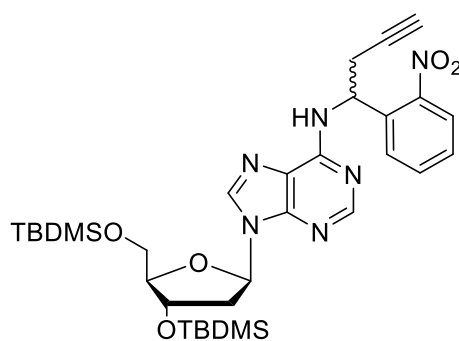
Die Synthese erfolgte gemäß einer Literaturvorschrift.<sup>[153]</sup> Verbindung **83** (5,55 g, 11,5 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP, 0,14 g, 1,15 mmol, 0,1 eq.) unter Argon in 70 ml abs. DCM gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Daraufhin wurde zuerst Diisopropylethylamin (DIPEA, 9,8 ml, 57,5 mmol, 5 eq.) und schließlich Triisopropylbenzylsulfonylchlorid (TIPSCI, 6,27 g, 20,7 mmol, 1,8 eq.) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für 15 Minuten bei 0 °C und dann für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung beendet und das Gemisch wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1).

Ausbeute: 4,96 g (6,64 mmol, 58%) *O*-Isomer + 3,39 g (4,54 mmol, 39%) *N*-Isomer

DC (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1):  $R_f = 0,55$  (*O*-Isomer), 0,45 (*N*-Isomer)

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 8,56$  (s, 1H, 2-H), 8,39 (s, 1H, 8-H), 7,22 (s, 2H, *meta*-H<sub>ar.</sub>), 6,50 (t,  $J = 6,4$  Hz, 1H, 1'-H), 4,62 (dt,  $J = 5,6, 3,5$  Hz, 1H, 3'-H), 4,36 (spt,  $J = 6,7$  Hz, 2H, *ortho*-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4,04 (pq,  $J = 3,3$  Hz, 1H, 4'-H), 3,91-3,85 (m, 1H, 5'-H), 3,80-3,74 (m, 1H, 5'-H), 2,93 (spt,  $J = 6,9$  Hz, 1H, *para*-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,69-2,59 (m, 1H, 2'-H), 2,51-2,42 (m, 1H, 2'-H), 1,30-1,26 (6xs, 18H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,92 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,90 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,11-0,08 (m, 12H, (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

### Synthese von 3'-5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*<sup>6</sup>-[1-(2-nitrophenyl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxyadeWnosin (**85**)



**85**

$C_{32}H_{48}N_6O_5Si_2$   
652,94 g/mol

Verbindung **84** (4,96 g, 6,64 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit NPBY-Amin **50** (1,52 g, 7,97 mmol, 1,2 eq.) in 65 ml DMF gelöst und mit Diisopropylethylamin (DIPEA, 2,3 ml, 13,3 mmol, 2 eq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für vier Tage bei 105 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt und der Rückstand direkt säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 -> 3:1).

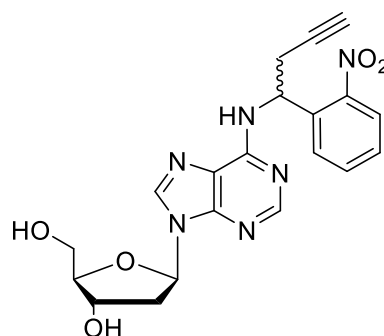
Ausbeute: 1,70 g (2,61 mmol, 39%)

DC (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1):  $R_f = 0.5$

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 8,68-8,62$  (m, 1H, NH), 8,35 (s, 1H, 2-H), 8,12-8,05 (m, 1H, 8-H), 7,91-7,86 (m, 2H, H<sub>ar.</sub>), 7,70-7,66 (m, 1H, H<sub>ar.</sub>), 7,50-7,41 (m, 1H, H<sub>ar.</sub>), 6,38-6,29 (m, 1H, 1'-H), 5,99-5,91 (m, 1H, NHCHCH<sub>2</sub>), 4,64-4,55 (m, 1H, 3'-H), 3,82-3,77 (m, 2H, 4'-H + 1x5'-H), 3,63-3,61 (m, 1H, 5'-H), 3,03-2,75 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CCH + CH<sub>2</sub>CCH + 1x2'-H), 2,30-2,21 (m, 1H, 1x2'-H), 0,88-0,81 (s, 18H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,10-(-0,03) (m, 12H, (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $C_{32}H_{48}N_6O_5Si_2$  [M+H]<sup>+</sup> 653,32975, gefunden 653,32837

( $\Delta m = 0,00062$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 1,0$  ppm)

**Synthese von *N*<sup>6</sup>-[1-(2-nitrophenyl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxyadenosin (**86**)****86**

C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>  
424,42 g/mol

Verbindung **85** (1,436 g, 2,20 mmol, 1 eq.) wurde in 12 ml abs. THF vorgelegt und mit Essigsäure (1,51 ml, 26,4 mmol, 12 eq.) versetzt. Unter Eiskühlung wurde TBAF (1M in THF, 6,6 ml, 6,6 mmol, 3 eq.) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für 30 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol 100:3 -> 100:8). Verbindung **86** wurde als farbloser Schaum isoliert (geringe Verunreinigung durch TBAF).

Ausbeute: 0,84 g (1,8 mmol, 85%)

DC (Dichlormethan/Methanol 100:3): R<sub>f</sub> = 0.3

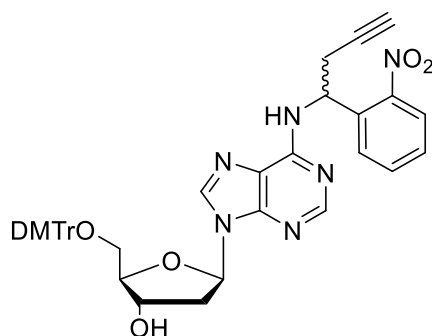
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8,72-8,60 (m, 1H, NH), 8,41 (s, 1H, 2-H), 8,17-8,05 (m, 1H, 8-H), 7,92-7,86 (m, 2H, H<sub>ar.</sub>), 7,70-7,66 (m, 1H, H<sub>ar.</sub>), 7,49-7,45 (m, 1H, H<sub>ar.</sub>), 6,39-6,29 (m, 1H, 1'-H), 5,96-5,91 (m, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 5,29 (s, 1H, 3'-OH), 5,10 (s, 1H, 5'-OH), 4,39-4,33 (m, 1H, 3'-H), 3,89-3,80 (m, 1H, 4'-H), 3,63-3,47 (m, 2H, 2x5'-H), 3,06-2,75 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CCH + CH<sub>2</sub>CCH), 2,74-2,65 (m, 1H, 1x2'-H), 2,28-2,15 (m, 1H, 1x2'-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125,77 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 172,4, 153,8, 152,3, 149,2, 148,9, 140,2, 138,0, 134,0, 128,8, 128,6, 124,3, 120,0, 88,3, 84,2, 81,8, 72,9, 71,2, 65,3, 62,1, 48,7, 24,9, 23,4, 15,5 ppm.

MALDI-HRMS: *m/z* berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 425,15679, gefunden 425,15618

(Δ*m* = 0,00061, relativer Fehler Δ*m*/*m* = 1,4 ppm)

**Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N<sup>6</sup>-[1-(2-nitrophenyl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxyadenosin (87)**



87

C<sub>41</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>  
726,79 g/mol

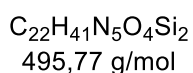
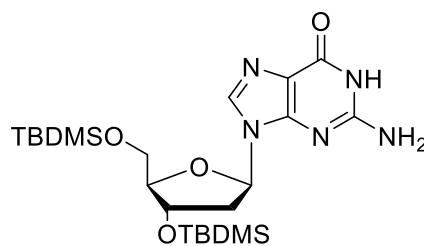
Verbindung **86** (743 mg, 1,75 mmol, 1 eq.) wurde zweimal mit je 15 ml abs. Pyridin koevaporiert und anschließend unter Argon in 35 ml abs. Pyridin gelöst. Unter Eiskühlung wurde daraufhin 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTr-Cl, 712 mg, 2,1 mmol, 1,2 eq.) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch unter Rühren über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt. Das Reaktionsgemisch wurde aufgrund unvollständigen Umsatzes mit weiteren 0,4 eq. DMTr-Cl versetzt und erneut für 16 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ethanol beendet und dann das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 75 ml DCM aufgenommen und mit je 75 ml 5%-iger Zitronensäure und ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 bis das Pyridin entfernt ist und dann Dichlormethan/Methanol 10:1), wobei das Kieselgel zu Beginn durch Zusatz von 1V-% NEt<sub>3</sub> deaktiviert wurde. Verbindung **87** wurde als Schaum isoliert.

Ausbeute: 582 mg (0,8 mmol, 46%)

DC (Dichlormethan/Methanol 100:5): R<sub>f</sub> = 0,15

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 8,72-8,60 (m, 1H, NH), 8,31 (s, 1H, 2-H), 8,07-7,99 (m, 1H, 8-H), 7,94-7,85 (m, 2H, H<sub>ar.</sub>), 7,70-7,65 (m, 1H, H<sub>ar.</sub>), 7,50-7,42 (m, 1H, H<sub>ar.</sub>), 7,32-7,29 (m, 2H, DMTr-H<sub>ar.</sub>), 7,25-7,09 (m, 7H, DMTr-H<sub>ar.</sub>), 6,92-6,78 (m, 4H, DMTr-H<sub>ar.</sub>), 6,45-6,25 (m, 1H, 1'-H), 5,97-5,90 (m, 1H, NHCHCH<sub>2</sub>), 5,36-5,30 (s, 1H, 3'-OH), 4,49-4,32 (m, 1H, 3'-H), 4,00-3,91 (m, 1H, 4'-H), 3,74-3,69 (m, 6H, -OCH<sub>3</sub>), 3,20-3,10 (m, 2H, 2x5'-H), 3,06-2,75 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CCH + CH<sub>2</sub>CCH + 1x2'-H), 2,33-2,16 (m, 1H, 1x2'-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125,77 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 170,5, 158,2, 153,6, 149,8, 149,0, 148,8, 145,0, 140,1, 137,9, 135,9, 135,6, 135,5, 133,8, 2x129,9, 129,8, 129,7, 128,6, 128,4, 127,9, 127,8, 126,7, 124,1, 119,9, 113,2, 86,0, 85,6, 83,7, 81,6, 72,7, 70,8, 64,2, 59,9, 55,2, 55,1, 48,8, 48,5, 45,9, 29,2, 24,8, 20,9, 14,3 ppm.

**Synthese von 3'-5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin (89)**

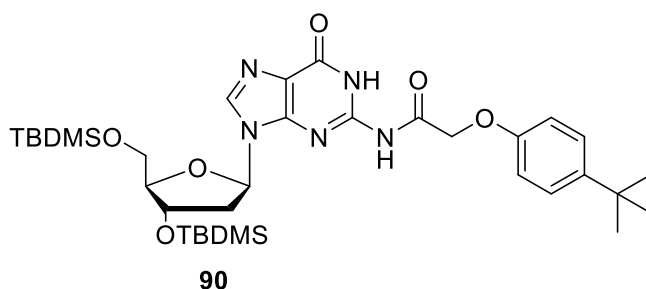
Die Synthese wurde gemäß einer Literaturvorschrift durchgeführt.<sup>[154]</sup> 2'-Desoxyguanosin (15,0 g, 56,1 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl, 33,84 g, 224,5 mmol, 4 eq.) und Imidazol (26,75 g, 392,9 mmol, 7 eq.) unter Argon in 35 ml abs. DMF gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit kaltem Ethanol gewaschen und dann im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt **89** wurde als weißer Feststoff erhalten und ohne weitere Aufarbeitung für die Folgereaktionen verwendet.

Ausbeute: 27,83 g

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 10,63 (s, 1H, NH), 7,87 (s, 1H, 8-H), 6,50 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 6,10 (t, J = 6,8 Hz, 1H, 1'-H), 4,51-4,46 (m, 1H, 3'-H), 3,84-3,77 (m, 1H, 4'-H), 3,69-3,65 (m, 2H, 2x5'-H), 2,70-2,57 (m, 1H, 2'-H), 2,28-2,19 (m, 1H, 2'-H), 0,89-0,84 (m, 18H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,10-0,01 (m, 12H, (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125,77 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 157,2, 154,2, 151,5, 135,4, 117,1, 87,5, 82,6, 72,7, 63,2, 56,5, 55,4, 49,1, 26,3, 26,2, 19,0, 18,5, 18,2, -4,3, -4,5, 2x -5,0 ppm.

### Synthese von 3'-5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*<sup>2</sup>-(4-*tert*-Butylphenoxyacetyl)-2'-desoxyguanosin (90)



$C_{34}H_{55}N_5O_6Si_2$   
686,01 g/mol

Verbindung **89** (5,0 g, 10,1 mmol, 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in 100 ml abs. Pyridin gelöst und unter Eiskühlung tropfenweise mit 4-*tert*-Butylphenoxyacetylchlorid (3,43 g, 15,1 mmol, 1,5 eq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für zwei Stunden bei 0 °C gerührt und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur weitergerührt. Daraufhin wurde die Reaktion durch Zugabe von 120 ml Methanol beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde dreimal mit Toluol koevaporiert und dann säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 -> 1:1).

Ausbeute: 2,58 g (3,76 mmol, 38%)

DC (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1):  $R_f = 0,25$

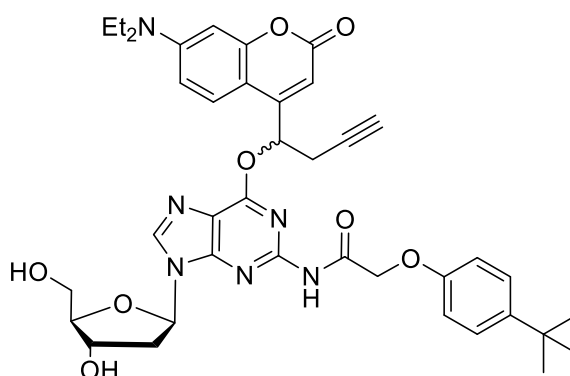
<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 11,78$  (s, 2H, NH), 8,22 (s, 1H, 8-H), 7,32 (d,  $J = 8,9$  Hz, 2H, *H*<sub>ar.</sub>), 6,89 (d,  $J = 8,9$  Hz, 2H, *H*<sub>ar.</sub>), 6,22 (t,  $J = 6,6$  Hz, 1H, 1'-H), 4,83 (s, 2H, CH<sub>2</sub>O), 4,57-4,51 (m, 1H, 3'-H), 3,89-3,81 (m, 1H, 4'-H), 3,77-3,63 (m, 2H, 2x5'-H), 2,79-2,69 (m, 1H, 2'-H), 2,38-2,29 (m, 1H, 2'-H), 1,26 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,90-0,82 (m, 18H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,12-0,01 (m, 12H, (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125,77 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta = 171,1, 155,4, 154,9, 148,3, 147,3, 143,5, 137,4, 126,2, 120,5, 114,0, 87,3, 82,7, 72,0, 66,3, 63,5, 62,6, 59,8, 33,8, 31,3, 31,2, 30,2, 25,8, 25,7, 20,8, 20,7, 18,6, 18,0, 17,7, 14,1, 13,6, -4,8, -5,0, 2x -5,5$  ppm.

MALDI-HRMS:  $m/z$  berechnet für  $C_{34}H_{55}N_5O_6Si_2$  [M+H]<sup>+</sup> 686,37691, gefunden 686,37692 ( $\Delta m = 0,00001$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 0,1$  ppm)



**Synthese von *N*<sup>2</sup>-(4-*tert*-Butylphenoxyacetyl)-*O*<sup>6</sup>-[1-(7-(Diethylamino)cumarin-4-yl)but-3-in-1-yl]-2'-desoxyguanosin (**92**)**



**92**

C<sub>39</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>  
724,82 g/mol

Verbindung **90** (1,5 g, 2,1 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit DEACBY-Alkohol **56** (0,912 g, 3,2 mmol, 1,5 eq.) und Triphenylphosphin (1 g, 3,8 mmol, 1,8 eq.) in 16 ml abs. THF gelöst und dazu über 15 Minuten Diethylazodicarboxylat (DEAD, 2,2 M in Toluol, 1,74 ml, 3,8 mmol, 1,8 eq.) zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann mit 40 ml DCM verdünnt. Die organische Phase wurde mit dest. Wasser und Kochsalzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration des Trockenmittels im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1). Das Produkt **91** wurde mit DEAD-Hydrazin-Verunreinigungen isoliert und ohne weitere Aufreinigung im Folgeschritt eingesetzt. Verbindung **91** (1,04 g, 1,09 mmol, 1 eq.) wurde unter Argon in 6 ml abs. THF gelöst und mit Essigsäure (0,75 ml, 13,2 mmol, 12 eq.) versetzt. Hierzu wurde unter Eiskühlung TBAF (1M in THF, 3,3 ml, 3,3 mmol, 3 eq.) gegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol 100:5 -> 100:8)

Ausbeute: 335 mg (0,46 mmol, 22%)

DC (Dichlormethan/Methanol 10:1): R<sub>f</sub> = 0,2

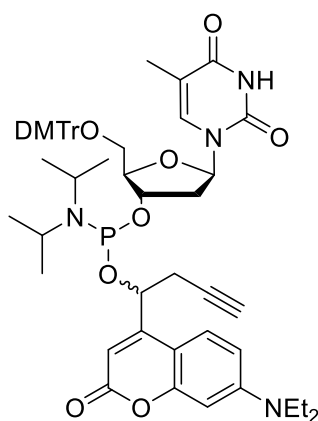
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 10,60 (s, 1H, NH), 8,53 (2xs, 1H, 8-H), 7,70-7,67 (m, 1H, DEACBY-H5), 7,25 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H<sub>ar.</sub>), 6,80-6,78 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>), 6,77-6,74 (m, 2H, H<sub>ar.</sub>), 6,66-6,64 (m, 1H, DEACBY-H6), 6,51-6,50 (m, 1H, DEACBY-H8), 6,36-6,33 (m, 1H, 1'-H), 6,08 (2xs, DEACBY-H3), 5,33-5,32 (m, 1H, 3'-OH), 5,00-4,84 (m, 3H, 5'-OH + CH<sub>2</sub>O), 4,43-4,39 (m, 1H, 3'-H), 3,88-3,84 (m, 1H, 4'-H), 3,62-3,56 (m, 1H, 1x5'-H), 3,55-3,48 (m, 1H, 1x5'-

H), 3,40 (q,  $J = 7,0$  Hz, 4H,  $N(CH_2CH_3)_2$ ), 3,19-3,12 (m, 1H,  $CHCH_2CCH$ ), 3,08-3,01 (m, 1H,  $CHCH_2CCH$ ), 3,00-2,98 (m, 1H,  $CHCH_2CCH$ ), 2,75-2,66 (m, 1H,  $1x2'$ -H), 2,32-2,26 (m, 1H,  $1x2'$ -H), 1,10 (t,  $J = 7,0$  Hz, 6H,  $N(CH_2CH_3)_2$ ) ppm.

$^{13}C$ -NMR (125,77 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 167,9, 160,6, 158,4, 156,1, 155,6, 153,2, 152,5, 152,4, 151,4, 150,4, 142,9, 2x141,8, 126,0, 125,6, 117,3, 117,2, 113,8, 108,9, 2x105,4, 104,9, 97,0, 87,9, 2x83,4, 79,2, 74,5, 71,0, 70,6, 67,3, 61,5, 54,9, 44,0, 33,8, 31,3, 29,0, 2x24,2, 13,5, 12,3$  ppm.

**MALDI-HRMS:**  $m/z$  berechnet für  $C_{39}H_{44}N_6O_8$   $[M+Na]^+$  747,31128, gefunden 747,31189 ( $\Delta m = 0,00061$ , relativer Fehler  $\Delta m/m = 0,8$  ppm)

**Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin-3'-O-[O-(1-(7-(Diethylamino)cumarin-4-yl)but-3-in-1-yl)]- $N,N'$ -diisopropylphosphoramidit (100)**



**100**

$C_{54}H_{63}N_4O_{10}P$   
959,09 g/mol

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin (218 mg, 0,5 mmol, 1,25 eq.) wurde in 1,23 ml abs. Dichlormethan suspendiert und im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. DEACBY-Alkohol **56** (263 mg, 0,4 mmol, 1 eq.) wurde in 0,82 ml Dichlormethan gelöst und mit Tetrazol (0,45 M in Acetonitril, 0,37 ml, 0,167 mmol, 0,42 eq.) versetzt. Diese Lösung wurde für fünf Minuten gerührt und dann über etwa 10 Minuten zur Lösung des Zuckers getropft. Das Reaktionsgemisch wurde für weitere 6 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Das Lösungsmittel wurde daraufhin im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Aceton 20:1 -> 10:1), wobei das Kieselgel zu Beginn durch Zusatz von 1V-%  $NEt_3$  deaktiviert wurde. Das Produkt wird als Gemisch aus vier Diastereomeren isoliert.

**Ausbeute:** 183 mg (0,19 mmol, 48%)

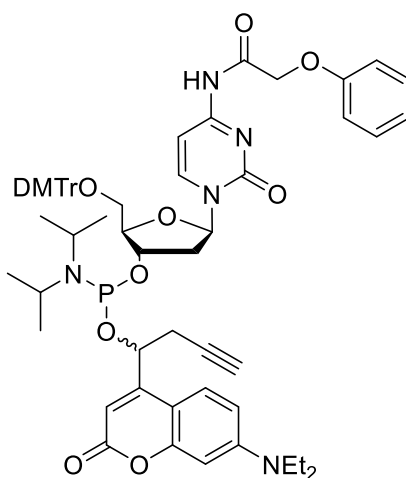
DC (Dichlormethan/Aceton 6:1):  $R_f = 0,7$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,27\text{-}8,08$  (m, 1H, NH), 7,68-7,49 (m, 1H, 6-H), 7,42-7,20 (m, 10H, DMTr-H<sub>ar.</sub> + DEACBY-H5), 6,85-6,80 (m, 4H, DMTr-H<sub>ar.</sub>), 6,60-6,43 (m, 2H, DEACBY-H6 + DEACBY-H8), 6,32-6,23 (m, 1H, 1'-H), 6,23-6,07 (4xs, 1H, DEACBY-H3), 5,14-4,89 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>), 4,79-4,52 (m, 1H, 3'-H), 4,28-3,97 (m, 1H, 4'-H), 3,79-3,78 (m, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,70-3,50 (m, 2H, NCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,44-3,33 (m, 5H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 1x 5'-H), 3,28-3,19 (m, 1H, 5'-H), 2,85-2,51 (m, 2H, OCHCH<sub>2</sub>), 2,45-2,38 (m, 1H, 1x 2'-H), 2,27-2,20 (m, 1H, 1x 2'-H), 2,11-1,91 (m, 1H, CCH), 1,30-1,17 (m, 21H, NCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 5-CH<sub>3</sub>) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125,77 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 163,5, 163,4, 162,1, 162,0, 161,9, 161,8, 2 \times 158,7, 156,7, 3 \times 156,5, 154,5, 154,4, 150,6, 3 \times 150,4, 150,3, 150,1, 2 \times 149,9, 149,4, 144,3, 2 \times 144,2, 141,1, 135,8, 135,7, 135,4, 2 \times 135,3, 2 \times 135,2, 130,1, 130,0, 129,9, 128,2, 2 \times 128,1, 2 \times 128,0, 127,2, 2 \times 127,1, 125,3, 125,2, 125,1, 124,9, 2 \times 113,2, 111,2, 111,1, 108,6, 108,5, 108,3, 107,2, 107,1, 107,0, 106,9, 106,7, 3 \times 105,7, 105,4, 2 \times 98,0, 87,0, 3 \times 86,9, 85,6, 85,5, 2 \times 85,4, 84,9, 2 \times 84,7, 2 \times 79,6, 79,4, 79,3, 74,2, 74,0, 73,6, 73,5, 71,7, 71,6, 2 \times 71,5, 2 \times 71,3, 71,1, 63,5, 63,3, 63,2, 63,0, 55,2, 46,3, 45,6, 45,5, 45,4, 45,3, 45,2, 44,7, 44,6, 43,4, 3 \times 43,3, 39,9, 30,9, 29,7, 29,2, 27,8, 27,5, 24,7, 2 \times 24,6, 2 \times 24,5, 24,4, 23,7, 23,2, 2 \times 23,1, 22,9, 22,8, 22,7, 22,1, 14,1, 2 \times 12,4, 2 \times 11,7, 11,5, 8,8, 1,0$

$^{31}\text{P-NMR}$  (202,48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 149,6, 149,2, 149,0, 148,7$  ppm.

**Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N<sup>4</sup>-phenoxyacetyl-2'-desoxycytidin-3'-O-[O-(1-(7-(Diethylamino)cumarin-4-yl)but-3-in-1-yl)]-N,N'-diisopropylphosphoramidit (102)**



**102**

$\text{C}_{61}\text{H}_{68}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}$   
1078,21 g/mol

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N<sup>t</sup>-phenoxyacetyl-2'-desoxycytidin (166 mg, 0,25 mmol, 0,96 eq.) wurde unter Argon in 0,6 ml abs. Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. DEACBY-Phosphordiamidid **98** (132 mg, 0,26 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit 5-(Benzylthio)-1H-tetrazol (BTT, 20 mg, 0,1 mmol, 0,4 eq.) unter Argon in 0,4 ml abs. Dichlormethan gelöst. Diese Lösung wurde daraufhin über einen Zeitraum von 10 Minuten zur Zucker-Lösung getropft und für 22 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Aceton 3:1). Das Produkt wird als Gemisch aus vier Diastereomeren isoliert.

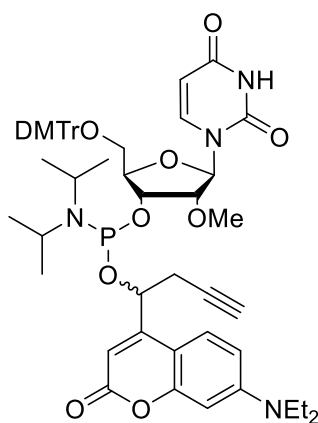
Ausbeute: 238 mg (0,22 mmol, 85%)

DC (Cyclohexan/Aceton 3:2): R<sub>f</sub> = 0,4

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9,00-8,97 (m, 1H, NH), 8,40-8,20 (4xd, J = 7,4 Hz, 1H, H-6), 7,54-7,43 (m, 1H, DEACBY-H5), 7,43-7,20 (m, 11H, H<sub>ar.</sub>), 7,15-7,06 (m, 2H, *para*-Pac-H<sub>ar.</sub> + H-5), 6,97-6,95 (m, 2H, *ortho*-Pac-H<sub>ar.</sub>), 6,87-6,81 (m, 4H, DMTr-H<sub>ar.</sub>), 6,60-6,46 (m, 2H, DEACBY-H6 + DEACBY-H8), 6,45-6,08 (m, 2H, 1'-H + DEACBY-H3), 5,12-4,93 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>CCH), 4,82-4,63 (m, 1H, 3'-H), 4,60-4,59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OPh), 4,32-3,99 (4xm, 1H, 4'-H), 3,81-3,79 (4xs, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3,69-3,23 (m, 8H, 2x NCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 2x 5'-H), 2,89-2,56 (m, 3H, OCHCH<sub>2</sub>CCH + 1x 2'-H), 2,49-2,20 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>CCH), 2,05-1,90 (4xt, J = 2,5 Hz, 1H, OCHCH<sub>2</sub>CCH), 1,23-0,98 (m, 18H, NCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

<sup>31</sup>P-NMR (202,48 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 150,5, 150,0, 149,1, 148,8 ppm.

**Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-methyluridin-3'-O-[O-(1-(7-(Diethylamino)cumarin-4-yl)but-3-in-1-yl)]-N,N'-diisopropylphosphoramidit (**104**)**



**104**

C<sub>54</sub>H<sub>63</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>P  
975,09 g/mol

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-methyluridin (280 mg, 0,5 mmol, 1 eq.) wurde unter Argon in 1,2 ml abs. Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. DEACBY-Phosphordiamidid **98** (263

mg, 0,51 mmol, 1,01 eq.) wurde zusammen mit 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (BTT, 32 mg, 0,17 mmol, 0,42 eq.) unter Argon in 0,8 ml abs. Dichlormethan gelöst. Diese Lösung wurde daraufhin über einen Zeitraum von 10 Minuten zur Zucker-Lösung getropft und über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt, für 9 Stunden bei 35 °C und schließlich nochmal über Nacht bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Aceton 3:1 -> 2:1). Das Produkt wird als Gemisch aus vier Diastereomeren in Form eines braunen Schaums isoliert.

Ausbeute: 107 mg (0,109 mmol, 27%)

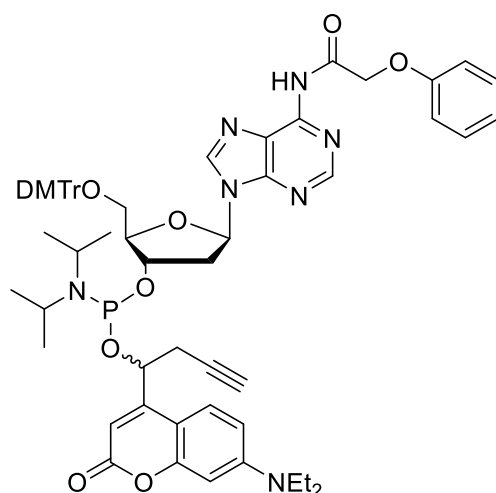
DC (Cyclohexan/Aceton 3:2):  $R_f = 0,4$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,51$  (bs, 1H, NH), 8,15-7,83 (4xd,  $J = 8,2$  Hz, 1H, H-6), 7,50-7,41 (m, 1H, DEACBY-H5), 7,40-7,18 (m, 9H, DMTr-H<sub>ar.</sub>), 6,88-6,80 (m, 4H, DMTr-H<sub>ar.</sub>), 6,58-6,27 (m, 2H, DEACBY-H6 + DEACBY-H8), 6,26-6,09 (4xs, 1H, DEACBY-H3), 6,08-5,90 (4xd,  $J = 3,0$  Hz, 1H, 1'-H), 5,32-5,11 (m, 2H, H-5 + OCHCH<sub>2</sub>CCH), 5,10-4,58 (m, 1H, 3'-H), 4,49-4,23 (m, 1H, 4'-H), 4,12-3,88 (m, 1H, 2'-H), 3,80-3,78 (4xs, 6H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3,71-3,28 (m, 11H, 2x5'-H + 2'-OCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 2x NCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,85-2,58 (m, 2H, OCHCH<sub>2</sub>CCH), 2,02-1,89 (4xt,  $J = 2,6$  Hz, 1H, OCHCH<sub>2</sub>CCH), 1,25-0,94 (m, 18H, NCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125,77 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2 \times 163,0, 2 \times 162,9, 2 \times 162,1, 2 \times 161,8, 2 \times 158,8, 158,7, 2 \times 156,6, 156,5, 2 \times 154,6, 154,4, 154,3, 3 \times 150,4, 150,3, 3 \times 150,0, 149,8, 144,5, 2 \times 144,2, 144,1, 140,4, 2 \times 140,3, 140,1, 135,2, 2 \times 135,1, 2 \times 135,0, 134,9, 3 \times 130,3, 130,1, 3 \times 128,3, 2 \times 128,1, 3 \times 128,0, 127,3, 2 \times 127,2, 125,2, 2 \times 125,0, 124,8, 2 \times 113,3, 2 \times 113,2, 108,7, 2 \times 108,5, 108,2, 107,2, 107,1, 107,0, 106,8, 106,0, 105,8, 105,5, 102,1, 102,0, 2 \times 101,9, 98,1, 2 \times 98,0, 97,9, 88,0, 87,8, 87,7, 87,3, 3 \times 87,2, 86,9, 83,8, 83,4, 83,3, 83,2, 83,1, 82,8, 82,6, 2 \times 82,5, 2 \times 82,4, 80,4, 77,3, 77,0, 76,8, 71,7, 71,6, 71,4, 71,0, 70,9, 70,8, 70,7, 70,6, 70,2, 70,1, 2 \times 70,0, 69,9, 69,5, 2 \times 69,4, 69,3, 61,4, 61,3, 60,8, 59,0, 58,9, 58,7, 58,6, 2 \times 58,5, 58,3, 2 \times 55,3, 53,5, 45,9, 45,2, 44,7, 44,6, 43,5, 2 \times 43,4, 43,3, 43,2, 31,9, 30,2, 29,7, 29,4, 29,3, 28,0, 27,7, 3 \times 27,3, 26,9, 24,8, 24,7, 2 \times 24,5, 2 \times 24,4, 24,3, 23,1, 22,7, 14,2, 2 \times 12,5, 12,4, 1,0$  ppm.

$^{31}\text{P-NMR}$  (202,48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 151,0, 150,8, 150,6, 150,1$  ppm.

**Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N<sup>4</sup>-phenoxyacetyl-2'-desoxyadenosin-3'-O-[O-(1-(7-(Diethylamino)cumarin-4-yl)but-3-in-1-yl)]-N,N'-diisopropylphosphoramidit (106)**



106

C<sub>62</sub>H<sub>68</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub>P  
1102,24 g/mol

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N<sup>4</sup>-phenoxyacetyl-2'-desoxyadenosin (172 mg, 0,25 mmol, 0,96 eq.) wurde unter Argon in 0,6 ml abs. Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. DEACBY-Phosphordiamidid **98** (132 mg, 0,26 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (BTT, 16 mg, 0,084 mmol, 0,32 eq.) unter Argon in 0,4 ml abs. Dichlormethan gelöst. Diese Lösung wurde daraufhin über einen Zeitraum von 10 Minuten zur Zucker-Lösung getropft und für 25 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Aceton 3:1). Das Produkt wird als Gemisch aus vier Diastereomeren isoliert.

Ausbeute: 150 mg (0,14 mmol, 56%)

DC (Cyclohexan/Aceton 3:1): R<sub>f</sub> = 0,15

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9,38 (bs, 1H, NH), 8,76-8,59 (m, 1H, H-2), 8,24-7,95 (m, 1H, H-8), 7,44-7,40 (m, 1H, DEACBY-H5), 7,40-7,16 (m, 11H, H<sub>ar.</sub>), 7,08-7,06 (m, 3H, *para*-Pac-H<sub>ar.</sub> + *ortho*-Pac-H<sub>ar.</sub>), 6,84-6,72 (m, 4H, DMTr-H<sub>ar.</sub>), 6,60-6,43 (m, 3H, DEACBY-H6 + DEACBY-H8 + DEACBY-H3), 6,27-6,20 (m, 1H, 1'-H), 5,15-5,00 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>CCH), 4,91-4,81 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OPh), 4,80-4,50 (m, 1H, 3'-H), 4,45-4,12 (m, 1H, 4'-H), 3,81-3,76 (m, 6H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3,70-3,47 (m, 2H, NCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,46-3,21 (m, 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 2x5'-H), 3,13-2,36 (m, 4H, OCHCH<sub>2</sub>CCH + 2x2'-H), 2,05-1,91 (m, 1H, OCHCH<sub>2</sub>CCH), 1,36-1,02 (m, 18H, NCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

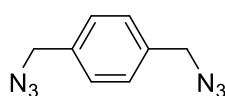
<sup>13</sup>C-NMR (125,77 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166,5, 162,1, 162,0, 2x158,5, 157,0, 156,5, 154,8, 152,5, 152,3, 151,5, 151,4, 2x150,4, 150,3, 2x148,2, 144,5, 144,3, 142,5, 142,4, 141,9, 135,7, 135,6,

135,4, 3x130,0, 129,9, 129,1, 2x128,1, 127,9, 127,8, 126,9, 126,8, 125,0, 124,8, 123,1, 122,4, 115,0, 2x113,1, 108,5, 2x108,4, 107,2, 107,0, 105,8, 2x98,0, 87,5, 86,7, 86,5, 86,4, 85,9, 85,2, 85,1, 85,0, 84,7, 2x79,6, 74,3, 74,2, 73,3, 72,6, 71,8, 71,5, 71,4, 71,2, 69,9, 68,1, 63,6, 63,2, 63,0, 55,2, 53,4, 46,4, 2x44,7, 43,5, 2x43,4, 2x43,3, 39,8, 38,5, 29,7, 29,4, 27,7, 26,9, 2x24,6, 24,3, 22,9, 22,6, 22,2, 22,1, 18,7, 14,1, 2x12,4, 1,0 ppm.

$^{31}\text{P}$ -NMR (202,48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 150,5, 149,8, 149,4, 149,0$  ppm.

#### 4.2.4 Synthese der Azid-Verbindungen

##### Synthese von 1,4-Bis(azidomethyl)benzol (**93**)



**93**

$\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_6$   
188,19 g/mol

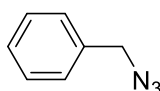
1,4-Bis(bromomethyl)benzol (1,32 g, 5 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit Natriumazid (0,67 g, 10 mmol, 2 eq.) in 7,5 ml abs. DMF gelöst und für acht Stunden bei 60 °C gerührt. Das Gemisch wurde mit 25 ml dest. Wasser und 25 ml DCM verdünnt und dann dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtration des Trockenmittels wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1). Verbindung **93** wurde als gelbes Öl erhalten, welches allmählich zu einem gelben Feststoff kristallisiert.

Ausbeute: 1,035 g (quantitative Umsetzung)

DC (Cyclohexan):  $R_f = 0.1$

$^1\text{H}$ -NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,36$  (s, 4H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 4,37 (s, 4H,  $\text{CH}_2$ ) ppm.

##### Synthese von (Azidomethyl)benzol (**94**)



**94**

$\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_3$   
133,15 g/mol

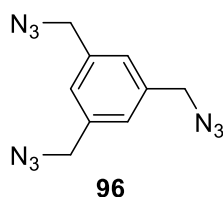
Verbindung **94** wurde gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift AAV2 ausgehend von (Brommethyl)benzol (1 mmol) dargestellt (Aufreinigung mit DCM anstatt Diethylether). Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1).

Ausbeute: 65 mg (0,49 mmol, 49%)

DC (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1):  $R_f = 0.55$

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,43\text{-}7,36$  (m, 5H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 4,35 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ) ppm.

### Synthese von 1,3,5-Tris(azidomethyl)benzol (**96**)



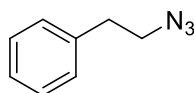
$\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_9$   
243,23 g/mol

1,3,5-Tris(bromomethyl)benzol (107 mg, 0,3 mmol, 1 eq.) wurde zusammen mit Natriumazid (195 mg, 33 mmol, 10 eq.) in 3 ml abs. DMF suspendiert und für 18 Stunden bei 65 °C, sowie 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in 40 ml einer 1:1-Mischung aus Diethylether/dest. Wasser aufgenommen, die organische Phase abgetrennt und diese mit 20 ml ges. Kochsalz-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde daraufhin über Natriumsulfat getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt (nicht unter 850 mbar, Vorsicht: **Explosionsgefahr!!**). Das Produkt wurde als braunes Öl erhalten.

Ausbeute: 71 mg (0,29 mmol, 97%)

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,27$  (s, 3H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 4,41 (s, 6H,  $\text{CH}_2$ ) ppm.

### Synthese von (2-Azidoethyl)benzol (**108**)



$\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_3$   
147,18 g/mol

Verbindung **108** wurde gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift AAV2 ausgehend von (2-Bromomethyl)benzol (1 mmol) dargestellt.



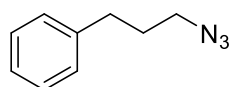
Ausbeute: 143 mg (0,97 mmol, 97%)

DC (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1):  $R_f = 0.64$

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,36\text{-}7,21$  (m, 5H,  $\text{H}_{\text{ar.}}$ ), 3,51 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{N}_3\text{-CH}_2$ ), 2,89 (t,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{Ph-CH}_2$ ) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit bereits publizierten Daten.<sup>[155]</sup>

### Synthese von (3-Azidopropyl)benzol (**109**)



**109**

$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3$   
161,21 g/mol

Verbindung **109** wurde gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift AAV2 ausgehend von (3-Brompropyl)benzol (1 mmol) dargestellt.

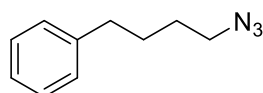
Ausbeute: 155 mg (0,98 mmol, 98%)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,31\text{-}7,28$  (m, 2H, *meta*- $\text{H}_{\text{ar.}}$ ), 7,22-7,17 (m, 3H, *ortho*- $\text{H}_{\text{ar.}}$  + *para*- $\text{H}_{\text{ar.}}$ ), 3,29 (t, 2H,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{N}_3\text{-CH}_2$ ), 2,71 (t,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 1,92 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100,61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 140,8, 128,5, 128,4, 126,1, 50,6, 32,7, 30,4$  ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit bereits publizierten Daten.<sup>[156]</sup>

### Synthese von (4-Azidobutyl)benzol (**110**)



**110**

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3$   
175,24 g/mol

Verbindung **110** wurde gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift AAV2 ausgehend von (4-Brombutyl)benzol (1 mmol) dargestellt.

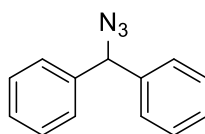
Ausbeute: 175 mg (quantitative Umsetzung)

DC (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1):  $R_f = 0.57$

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,32\text{-}7,16$  (m, 5H,  $\text{H}_{\text{ar.}}$ ), 3,28 (t, 2H,  $J = 6,5$  Hz,  $\text{N}_3\text{-CH}_2$ ), 2,65 (t,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{Ph-CH}_2$ ), 1,75-1,59 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ) ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit bereits publizierten Daten.<sup>[157]</sup>

### Synthese von Diphenylmethylazid (**111**)



**111**

$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3$   
209,25 g/mol

Verbindung **111** wurde gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift AAV2 ausgehend von Diphenylmethylbromid (1 mmol) dargestellt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1 -> 6:1).

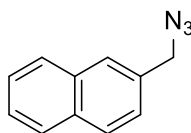
Ausbeute: 189 mg (0,9 mmol, 90%)

DC (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1):  $R_f = 0.47$

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,40\text{-}7,30$  (m, 10H,  $\text{H}_{\text{ar.}}$ ), 5,72 (s, 1H,  $(\text{Ph})_2\text{CHN}_3$ ), ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit bereits publizierten Daten.<sup>[158]</sup>

### Synthese von 2-(Azidomethyl)naphthalen (**112**)



**112**

$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_3$   
183,21 g/mol

Verbindung **112** wurde gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift AAV2 ausgehend von 2-(Brommethyl)naphthalen (1 mmol) dargestellt.

Ausbeute: 175 mg (0,96 mmol, 96%)

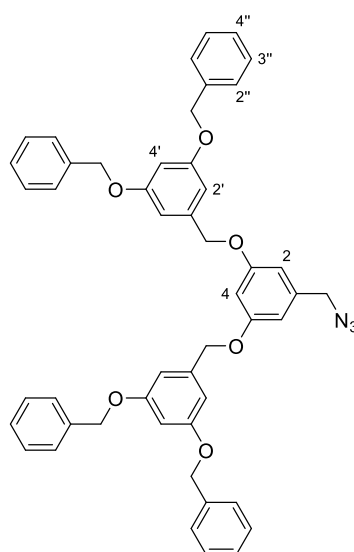
DC (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1):  $R_f = 0.53$

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,89\text{-}7,84$  (m, 3H,  $\text{H}_{\text{ar.}}$ ), 7,78 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{ar.}}$ ), 7,53-7,50 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{ar.}}$ ), 7,43 (dd,  $J = 8,4, 1,7$  Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar.}}$ ), 4,51 (s, 2H,  $\text{N}_3\text{-CH}_2$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (75,44 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 133,3, 133,1, 132,8, 128,8, 127,9, 127,8, 127,2, 126,5, 126,3, 125,9, 55,0$  ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit bereits publizierten Daten.<sup>[159]</sup>

### Synthese von 3,5-Bis[3,5-bis(benzyloxy)benzyloxy]-benzylazid (**113**)



$\text{C}_{49}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_6$   
769,90 g/mol

**113**

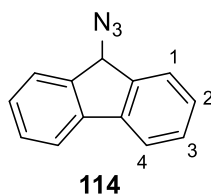
Verbindung **113** wurde gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift AAV2 ausgehend von 3,5-Bis[3,5-bis(benzyloxy)benzyloxy]-benzylbromid (1 mmol) dargestellt.

Ausbeute: 770 mg (quantitative Umsetzung)

DC (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1):  $R_f = 0.43$

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,43\text{-}7,31$  (m, 20H,  $2''\text{+}3''\text{+}4''\text{-H}_{\text{ar.}}$ ), 6,68-6,67 (m, 4H,  $2'\text{-H}_{\text{ar.}}$ ), 6,57 (m, 2H,  $2\text{-H}_{\text{ar.}}$ ), 6,54 (m, 3H,  $4'\text{+}4\text{-H}_{\text{ar.}}$ ), 5,04 (s, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 4,97 (s, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 4,25 (s, 2H,  $\text{N}_3\text{-CH}_2$ ) ppm.

### Synthese von 9-Azidfluoren (114)



**114**  
 $C_{13}H_9N_3$   
 207,24 g/mol

9-Bromfluoren (0,249 g, 1 mmol, 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in 3,5 ml Aceton gelöst und anschließend Natriumazid (0,342 g, 5,3 mmol, 5,3 eq.) in 1,5 ml dest. Wasser hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde das Aceton im Vakuum entfernt und die wässrige Phase zweimal mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1). Verbindung **114** wurde als gelber Feststoff isoliert.

Ausbeute: 136 mg (0,66 mmol, 66%)

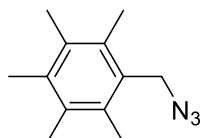
DC (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1):  $R_f = 0.34$

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 7,71$  (d,  $J = 7,5$  Hz, 2H, 4- $H_{ar.}$ ),  $7,63$  (d,  $J = 7,5$  Hz, 2H, 1- $H_{ar.}$ ),  $7,45$  (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H, 2- $H_{ar.}$ ),  $7,36$  (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz, 2H, 3- $H_{ar.}$ ),  $5,21$  (s, 1H,  $N_3-CH$ ) ppm.

$^{13}C$ -NMR (75,44 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 141,6, 140,7, 129,4, 127,9, 125,3, 120,3, 64,3$  ppm.

Die spektroskopischen Daten sind im Einklang mit bereits publizierten Daten.<sup>[160]</sup>

### Synthese von 1-(Azidomethyl)-2,3,4,5,6-pentamethylbenzol (115)



**115**  
 $C_{12}H_{17}N_3$   
 203,29 g/mol

1-(Hydroxymethyl)-2,3,4,5,6-pentamethylbenzol (0,179 g, 1 mmol, 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in 10 ml abs. Dichlormethan vorgelegt und hierzu Triethylamin (0,28 ml, 2 mmol, 2 eq.) gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 3,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann mit 32 ml ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 5 ml Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtration des Trockenmittels wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde zusammen mit Natriumazid (0,26 g, 4 mmol, 4 eq.) in 13 ml abs. DMF gelöst und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde mit 20 ml einer 1:1-Mischung aus Diethylether und dest. Wasser verdünnt. Es wurde dreimal mit je 7 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen einmal mit 10 ml ges. Kochsalzlösung gewaschen und dann über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration des Trockenmittels wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Verbindung **115** wurde in Form farbloser Kristalle isoliert.

Ausbeute: 199 mg (0,98 mmol, 98%)

DC (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1):  $R_f = 0.63$

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 4,47$  (s, 2H,  $\text{N}_3\text{-CH}_2$ ), 2,31 (s, 6H, *meta*- $\text{CH}_3$ ), 2,25 (s, 3H, *para*- $\text{CH}_3$ ), 2,24 (s, 6H, *ortho*- $\text{CH}_3$ ) ppm.

### 4.3 Darstellung und Charakterisierung photolabil modifizierter Oligonukleotide

#### Oligonukleotidsynthese

Alle Oligonukleotid-Festphasensynthesen wurden an einem ABI 392 DNA/RNA Synthesizer der Firma *Applied Biosystems* mit ABI CPG-Säulen (1  $\mu\text{mol}$ , 1000 Å Porengröße) durchgeführt. Für die photolabil geschützten Oligonukleotide wurden Ultramild®-Phosphoramidite der Firma *Link Technologies*, sowie von *Sigma Aldrich* bezogen und in einer Konzentration von 0,1 M in Acetonitril für die Synthesen verwendet. Photolabil modifizierte Phosphoramidite wurden, wenn nicht anders beschrieben, in einer Konzentration von 0,12 M in Acetonitril verwendet. Für die Festphasensynthese wurden ferner folgende Reagenzien verwendet: 0,3 M BTT (5-Benzylthio-1*H*-tetrazol) oder 0,25 M ETT (5-Ethylthio-1*H*-tetrazol) in Acetonitril als Aktivator, 3% Trichloressigsäure in Dichlormethan zur Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe, Cap A (THF/Pyridin/Phenoxyacetylanhydrid 85:10:5) und Cap B (10% 1-Methylimidazol in THF) zum Deaktivieren nicht reagierter 5'-OH-Gruppen und 0,02 M Iod in Pyridin/THF/Wasser (7:2:1) zur Oxidation. Die Synthesen erfolgten im DMTr-On-Modus. Im Anschluss an die Festphasensynthese wurde das CPG-Material für zwei Stunden mit 32%-iger wässriger  $\text{NH}_3$ -Lösung inkubiert, über einen Zentrifugenfilter filtriert und das Filtrat mit Hilfe

einer Vakuumzentrifuge bei 4 °C eingeengt. Der Rückstand wurde daraufhin mittels RP-HPLC (MultoKrom 100-5 C18, 0.1 M Triethylammoniumacetat pH 7, Acetonitril, Gradient A: 5% zu 40% MeCN in 33 Min, Flussrate 1 ml/min) aufgereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge wurde der Rückstand zur Abspaltung der 5'-DMTr-Schutzgruppe für 20 Minuten mit 80%-iger wässriger Essigsäure versetzt, die Lösung erneut mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge eingeengt und dann per RP-HPLC (MultoKrom 100-5 C18, 0.1 M Triethylammoniumacetat pH 7, Acetonitril, Gradient A: 5% zu 40% MeCN in 33 Min, Flussrate 1 ml/min) aufgereinigt.

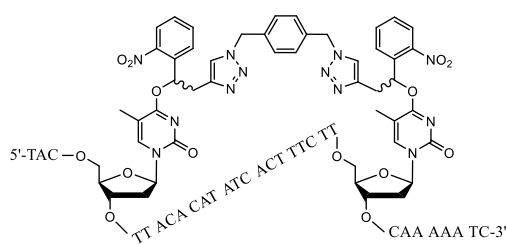
### **Allgemeine Prozedur zur Herstellung zyklisierter 32-mer Oligonukleotide**

Zu einer wässrigen Lösung der photolabil geschützten und Alkin-modifizierten Oligonukleotide (5-18 nmol, finale Konz. 20-30 µM) in einem Reaktions-Eppendorf-Gefäß wurde in folgender Reihenfolge hinzugegeben: 1M TEAA-Puffer (finale Konz. 0,1 M), Bisazido-Linker Lösung A (1 Äq.), DMSO (28 Volumen-% der finalen Lösung), Cu(II)TBTA-Komplex-Lösung B (33 Äq.) und TCEP-Lösung C (33 Äq.). Das Reaktionsgefäß wurde unter Argon verschlossen und für 18 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde in einer Vakuumzentrifuge bei 4 °C und vermindertem Druck entfernt und der DNA-Rückstand in 1M TEAA gelöst. Der Überstand wurde über RP-HPLC aufgereinigt (Gradient A, MultoKrom 100-5 C18).

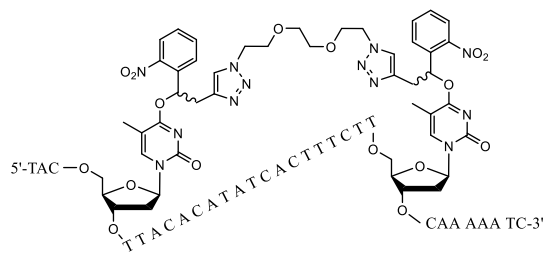
Stammlösung A: Bisazido-Linker (2,69 mM in H<sub>2</sub>O/DMSO/tBuOH 4:3:1)

Stammlösung B: 100 µl CuSO<sub>4</sub> (5,38 mM in H<sub>2</sub>O) + 100 µl TBTA (5,38 mM in DMSO/tBuOH 3:1)

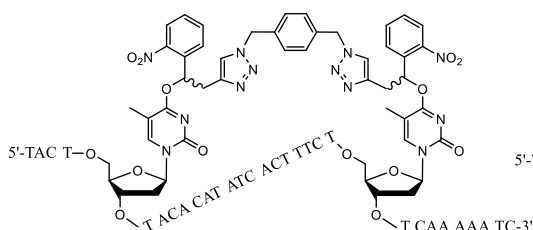
Stammlösung C: TCEP·HCl (2,69 mM in H<sub>2</sub>O, frisch hergestellt)



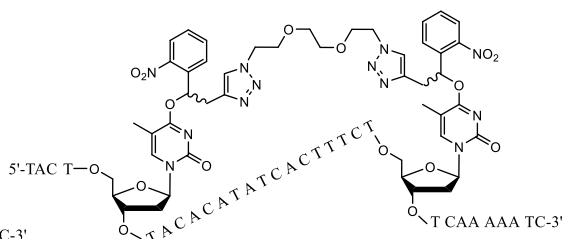
NPBY-AMB-4-24-CON



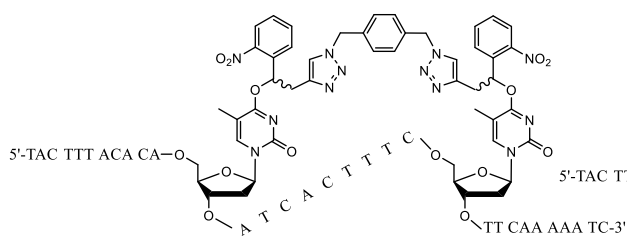
NPBY-PEG-4-24-CON



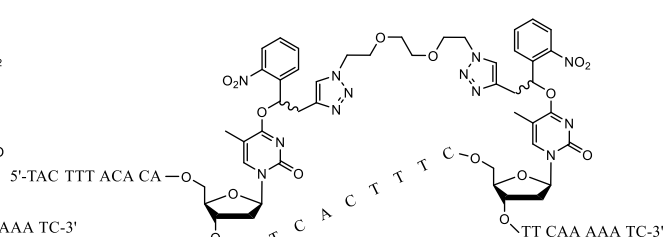
NPBY-AMB-5-23-CON



NPBY-PEG-5-23-CON

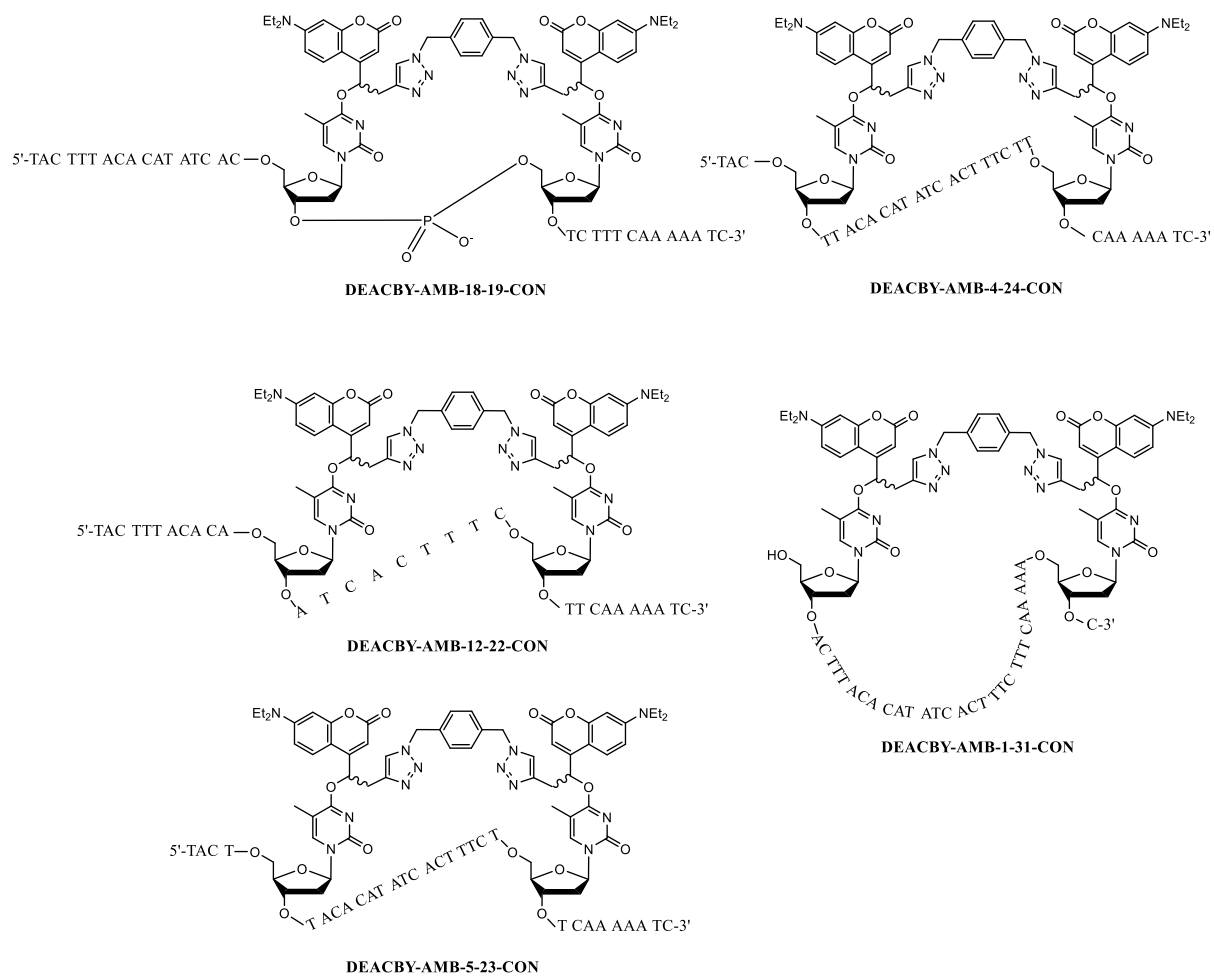


NPBY-AMB-12-22-CON



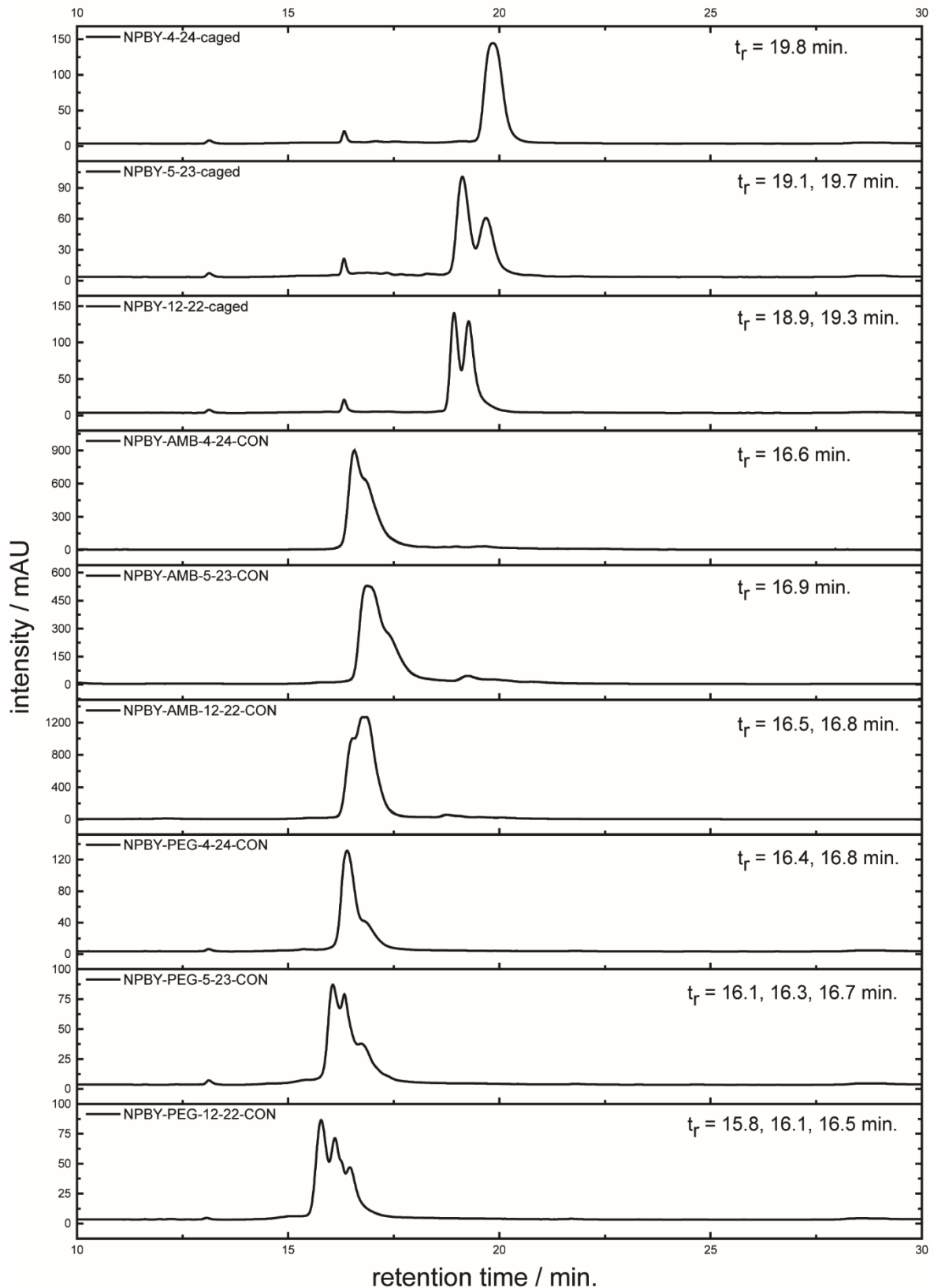
NPBY-PEG-12-22-CON

Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gemessen [Da]
<b>NPBY-AMB-4-24-cON</b>	10180,9	10184,4
<b>NPBY-AMB-5-23-cON</b>	10180,9	10183,3
<b>NPBY-AMB-12-22-cON</b>	10180,9	10183,3
<b>NPBY-PEG-4-24-cON</b>	10192,9	10194,2
<b>NPBY-PEG-5-23-cON</b>	10192,9	10195,3
<b>NPBY-PEG-12-22-cON</b>	10192,9	10195,3

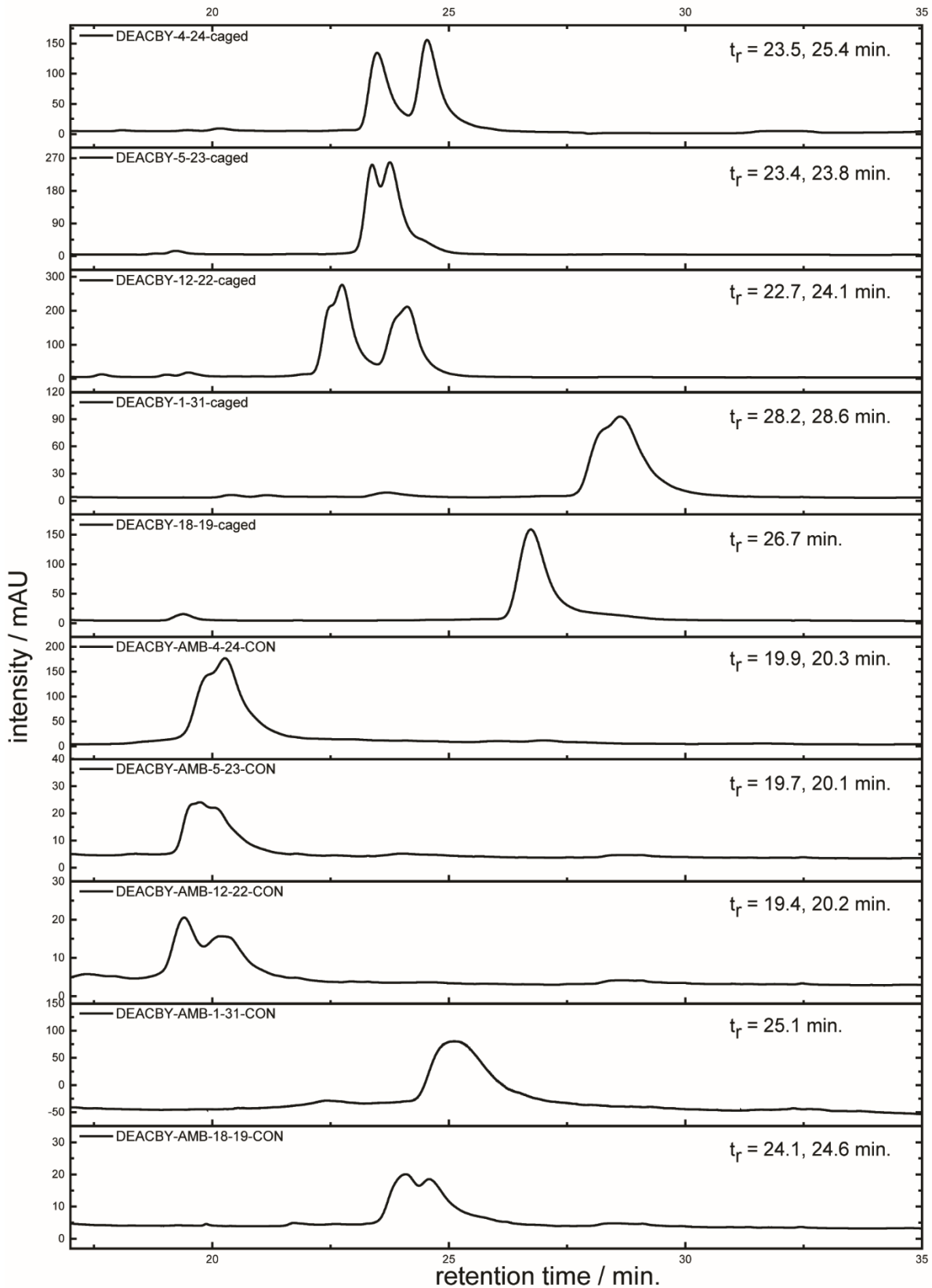


Oligonukleotid	berechnete Masse [Da]	gemessen [Da]
<b>DEACBY-AMB-18-19-cON</b>	10369,2	10372,7
<b>DEACBY-AMB-12-22-cON</b>	10369,2	
<b>DEACBY-AMB-5-23-cON</b>	10369,2	10372,7
<b>DEACBY-AMB-4-24-cON</b>	10369,2	10372,7
<b>DEACBY-AMB-1-31-cON</b>	10369,2	10371,7

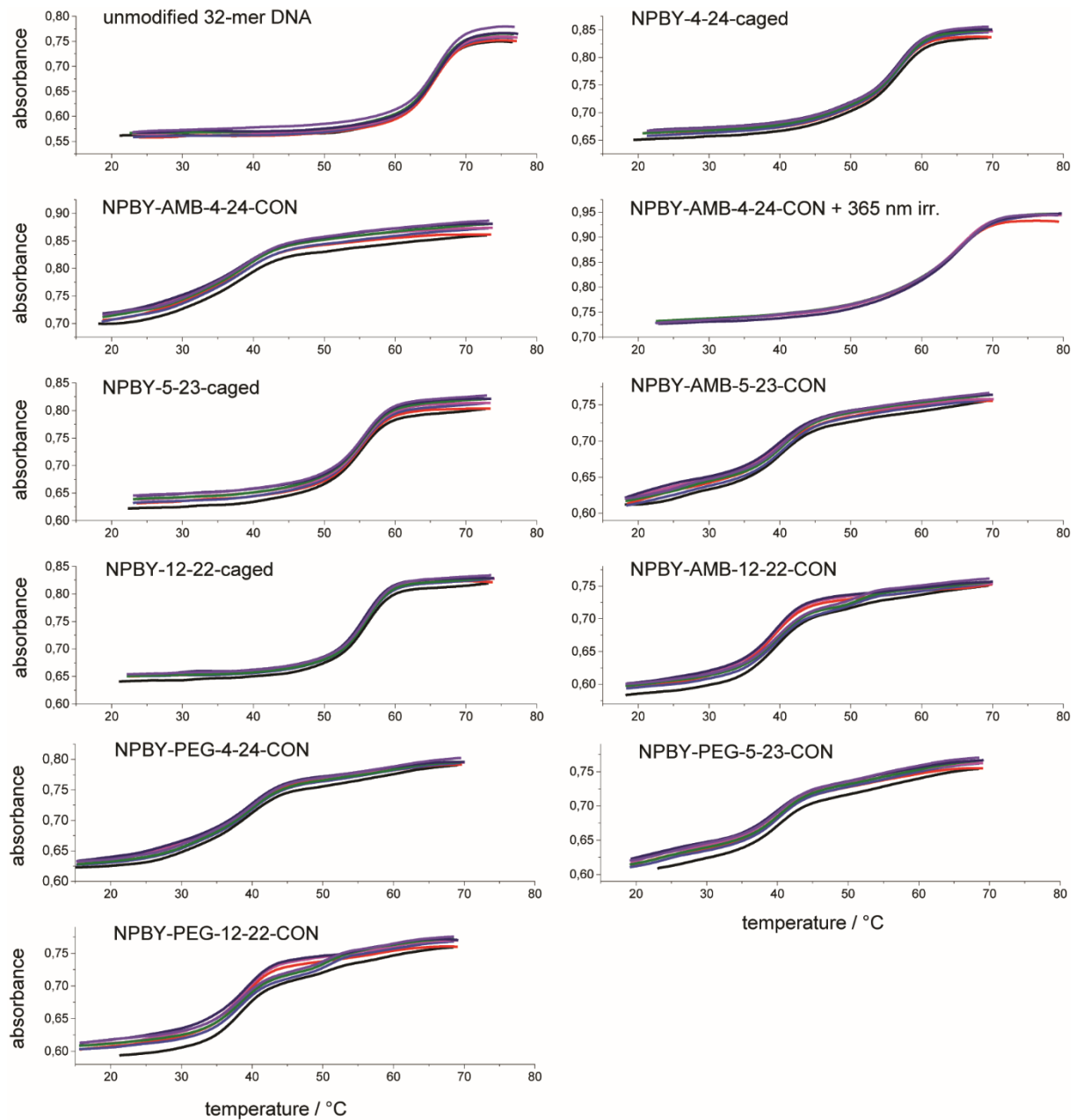




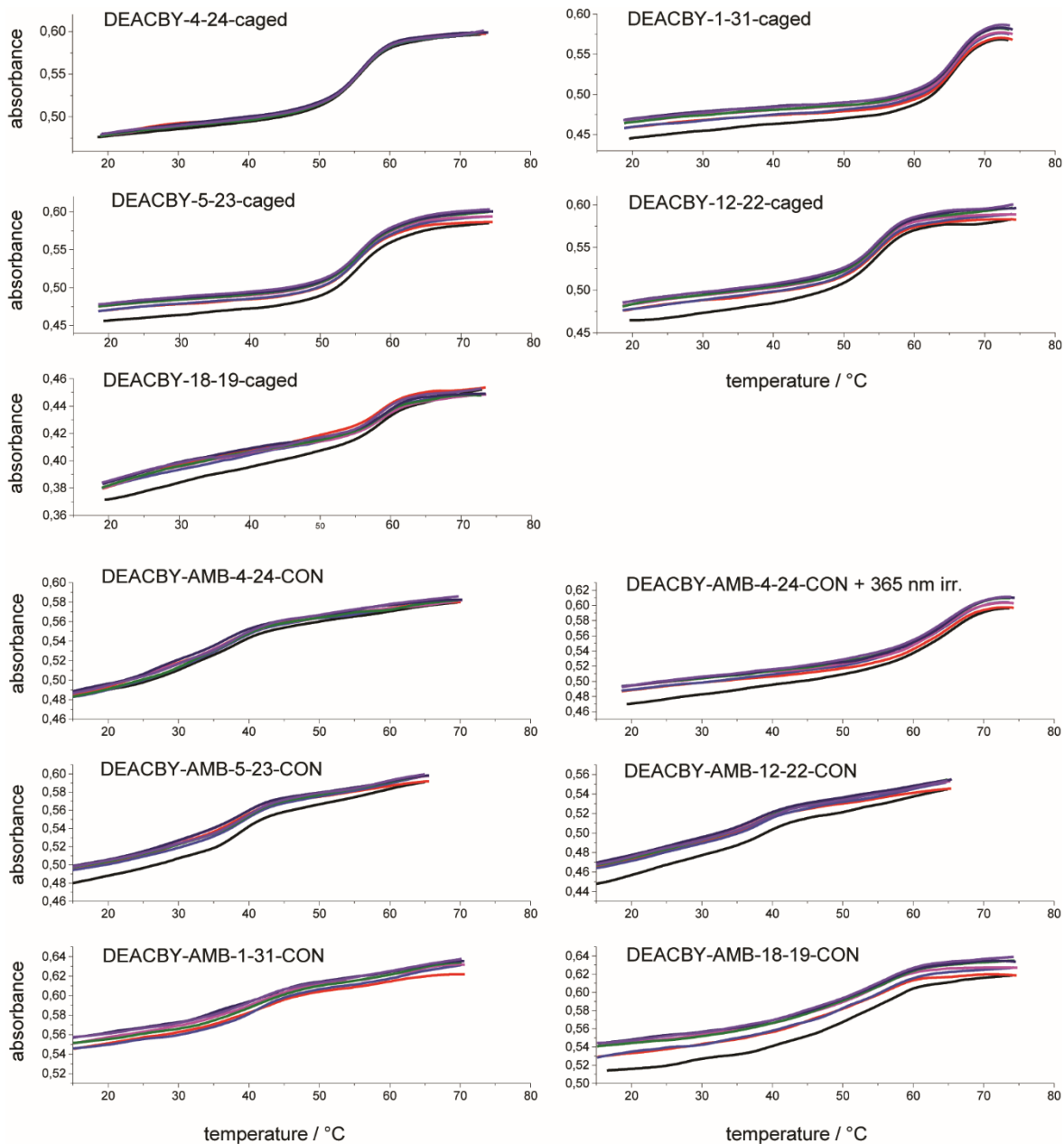
**Abb. 93** RP-HPLC-Chromatogramme der photolabil-geschützten und zyklisierten NPBY modifizierten 32-mer DNA Oligonucleotide (Diastereomerenmischungen)



**Abb. 94** RP-HPLC-Chromatogramme der photolabil-geschützten und zyklisierten DEACBY modifizierten 32-mer DNA Oligonukleotide (Diastereomerengemische)



**Abb. 95** Temperaturabhängige UV/Vis-Spektroskopie (Schmelzpunktkurven) der untersuchten nativen, linear photolabil geschützten und zyklisierten Oligonukleotide ( $1 \mu\text{M}$  sense und antisense-Strang in  $1\times\text{PBS}$ -Puffer) mit NPBY-Modifikation ( $n = 7$ ).



**Abb. 96** Temperaturabhängige UV/Vis-Spektroskopie (Schmelzkurven) der untersuchten nativen, linear photolabil geschützten und zyklisierten Oligonukleotide ( $1 \mu\text{M}$  sense und antisense-Strang in  $1\times\text{PBS}$ -Puffer) mit DEACBY-Modifikation ( $n = 7$ ).

### Allgemeine Prozedur zur Herstellung eines 7-37-73-zyklisierten C10-Aptamers

Zu einer wässrigen Lösung des 7-37-73-NPBY-geschützten C10-Aptamers (3,4 nmol, finale Konz.  $15 \mu\text{M}$ ) in  $50 \mu\text{l}$  MilliQ-Wasser in einem Reaktions-Eppendorf-Gefäßes wurde in folgender Reihenfolge hinzugefügt:  $11,4 \mu\text{l}$   $1\text{M}$  TEAA-Puffer (finale Konz.  $0,1 \text{M}$ ),  $1,5 \mu\text{l}$  Tris-Azidolinker-Lösung D ( $1,2 \text{Äq.}$ ),  $40 \mu\text{l}$  DMSO,  $62,9 \mu\text{l}$  Cu(II)TBTA-Komplex-Lösung B ( $50 \text{Äq.}$ ) und  $62,9 \mu\text{l}$  TCEP-Lösung C ( $50 \text{eq.}$ ). Das Reaktionsgefäß wurde unter Argon verschlossen und für 21 Stunden bei Raumtemperatur oder  $40 \text{°C}$  geschüttelt.  $100 \mu\text{l}$  MilliQ-Wasser wurden hinzugefügt und das Lösungsmittelgemisch mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge bei  $30 \text{°C}$  zur

Trockene eingengt. Der DNA-Rückstand wurde in 1 M TEAA-Puffer aufgenommen. Der Überstand wurde mittels RP-HPLC aufgereinigt (Gradient A, MultoKrom 100-5 C18)

Stammlösung D: Trisazido-Linker (2,69 mM in DMSO/tBuOH 3:1)

### **Allgemeine Prozedur für das ATTO647N-Markieren der C10-Aptamer-Varianten**

5'-Amino-modifizierte C10-Oligonukleotide (300-600 pmol, 1 Äq., finale Konz. 82-96 µM) wurden in wässrigem Borat-Puffer (Stammlösung E) mit ATTO647N-NHS-Ester-Lösung F (20 eq., finale Konz. 1,6 mM) versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde während 6 Stunden Reaktionszeit kontinuierlich geschüttelt und gelegentlich aufgewirbelt (Vortexer). Das Gemisch wurde mit 90 µl MilliQ-Wasser verdünnt und dann direkt mittels RP-HPLC aufgereinigt (Gradient A, MultoKrom 100-5 C18)

Stammlösung E: Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (100 mM in H<sub>2</sub>O, pH = 8,47)

Stammlösung F: ATTO647N-NHS-Ester (5,93 mM in DMSO)

### **AFM Experimente**

Eine Lösung von 20 µl von 0,1 mg Polyornithin in 1 ml MilliQ-Wasser wurde auf eine frisch exfolierte Glimmer-Oberfläche gegeben und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Oberfläche wurde mit MilliQ-Wasser gereinigt und mit Druckluft getrocknet. Eine DNA-Probe wurde von der Stammlösung auf eine finale Konzentration von 5,3 nM mit MilliQ-Wasser verdünnt. 10 µl dieser Probe wurde auf die frisch präparierte Glimmer-Oberfläche gegeben und für 3 Minuten inkubiert. Daraufhin wurde die Oberfläche mit MilliQ-Wasser gewaschen und mit Druckluft getrocknet. AFM-Bilder wurden auf einem JPK Nanowizard 3 AFM-Gerät im „Tapping“-Modus aufgenommen. Es wurden ACTA-Rasterkraftsonden (25-75 N/m) von APP Nano verwendet. Die freie Amplitude der Schwingung wurde auf 0,3 V gesetzt, typische Resonanzfrequenzen der Sonde lagen zwischen 200 und 400 kHz, Scanning-Frequenzen zwischen 0,5 und 2 Hz. Muscovit-Glimmer wurde von der Firma *Plano GmbH* bezogen.

### **Zellkulturstudien**

Zellen: Humane Burkitt-Lymphom-Zellen (RAMOS-Zellen) wurden von *DSMZ* (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen. RAMOS-Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 Medium (10% fötales Kälberserum) kultiviert.

Durchflusszytometrie: Durchflusszytometrie wurde mittels eines BD FACSCantoll-Zytometers durchgeführt. Für Bindungsexperimente wurden 2x10<sup>5</sup> RAMOS Zellen mit einer 200 nM ATTO647N-markierten Aptamer-Lösung in 100 µl Bindepuffer (1xHBSS, *Gibco Thermo Fisher Scientific* + 1,4 mM MgCl<sub>2</sub>) für 15 Minuten bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Belichtung der

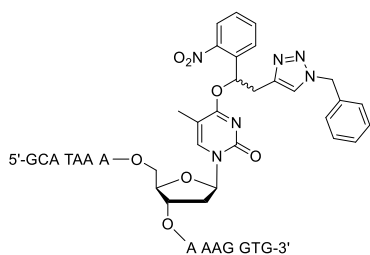
Aptamere erfolgte für 5 Minuten bei 365 nm. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit 1xHBSS-Puffer gewaschen und bei 200xg für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde in 200 µl HBSS-Puffer gelöst und 104 Zellen wurden per Durchflusszytometer analysiert. Die Daten wurden mit Hilfe der Software *FlowJo* ausgewertet.

Laser-Scanning-Mikroskopie: Konfokalbilder wurden mittels eines LSM 710 konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops der Firma *Zeiss* aufgenommen. Die Inkubation der Zellen wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese in 100 µl HBSS-Puffer auf Deckgläschen in 24-er Titrationsplatten platziert, mit einer 4%-igen *para*-Formaldehyd-Lösung fixiert und anschließend für 30 Minuten mit 300xg zentrifugiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Deckgläschen wurden zusammen mit Fixiermedium auf dem Objektträger befestigt über Nacht bei 4 °C und danach mit Nagellack versiegelt.

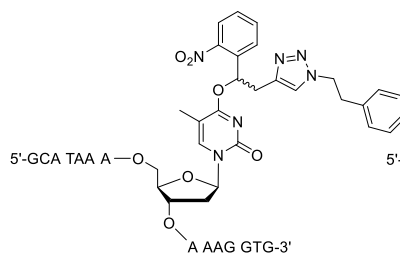
### **Allgemeine Prozedur für post-synthetische CuAAC-Click-Reaktionen zwischen DNA und sperrigen Azid-Substituenten**

Zu einer wässrigen Lösung eines photolabil-geschützten und Alkin-modifizierten Oligonukleotids (5 nmol, finale Konz. 35 µM) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde in folgender Reihenfolge hinzugefügt: 1 M TEAA-Puffer (finale Konz. 0,1 M), Monoazid-Lösung G (10 Äq.), DMSO (30 Volumen-% in der finalen Lösung), Cu(II)TBTA-Komplex-Lösung B (20 Äq.) und TCEP-Lösung C (20 Äq.). Das Reaktionsgefäß wurde unter Argon verschlossen und für 18 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt oder für 1,5 Stunden in einer Mikrowelle auf 60 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde in einer Vakuumzentrifuge unter vermindertem Druck bei 4 °C entfernt und der DNA-Rückstand in 200 µl einer 2 M TEAA-Puffer-Lösung aufgenommen. Der Überstand wurde mittels RP-HPLC aufgereinigt (Gradient A, MultoKrom 100-5 C18).

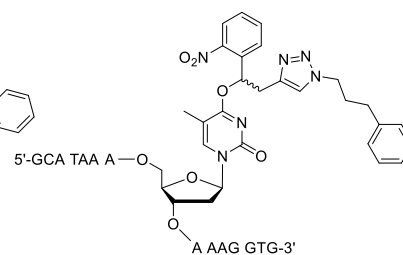
Stammlösung F: Monoazid (2,69 mM in DMSO/tBuOH 3:1)



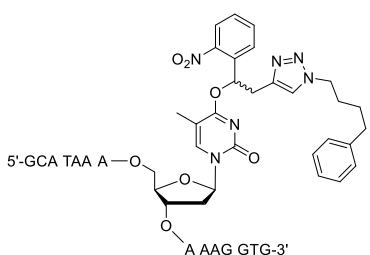
ODN 3b



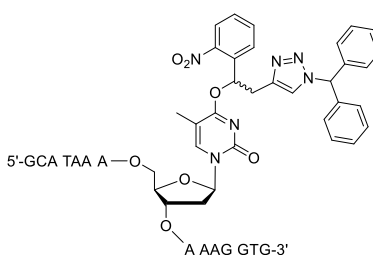
ODN 3c



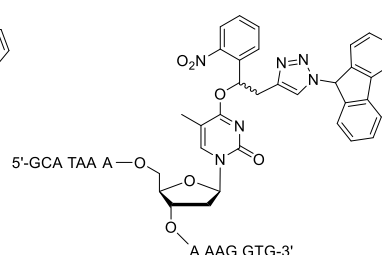
ODN 3d



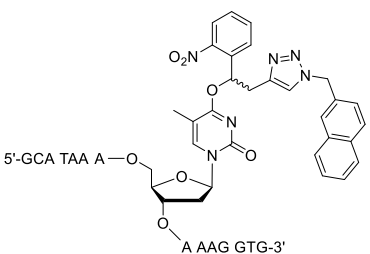
ODN 3e



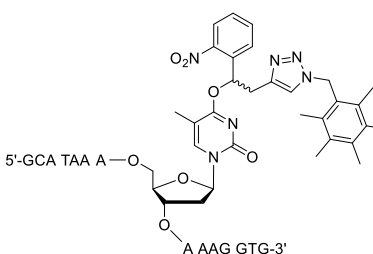
ODN 3f



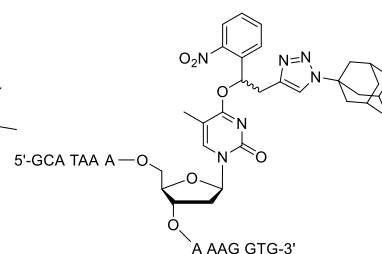
ODN 3g



ODN 3h



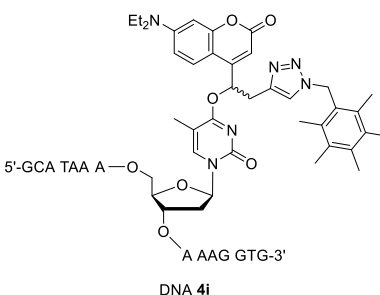
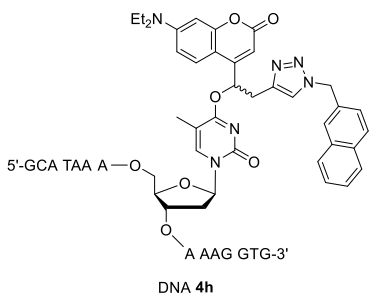
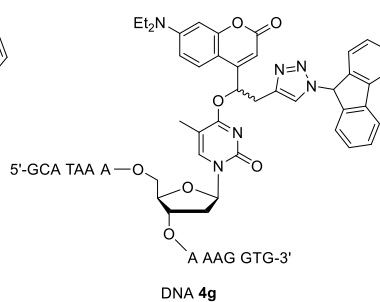
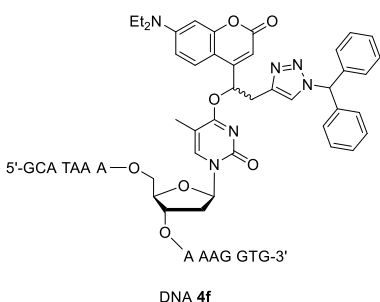
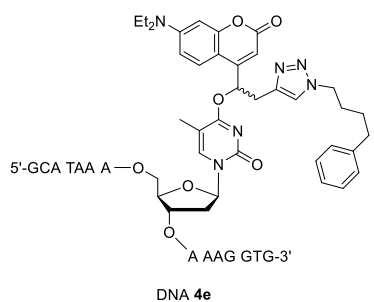
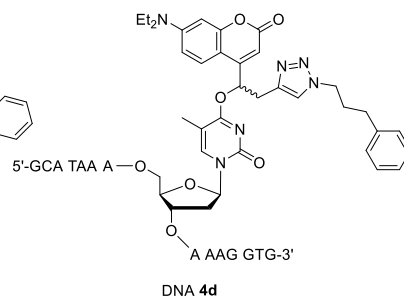
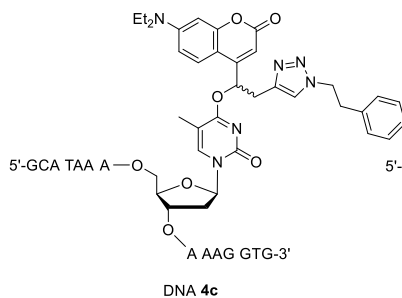
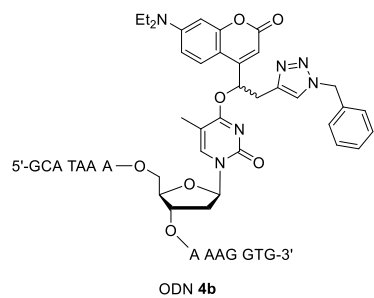
ODN 3i



ODN 3j

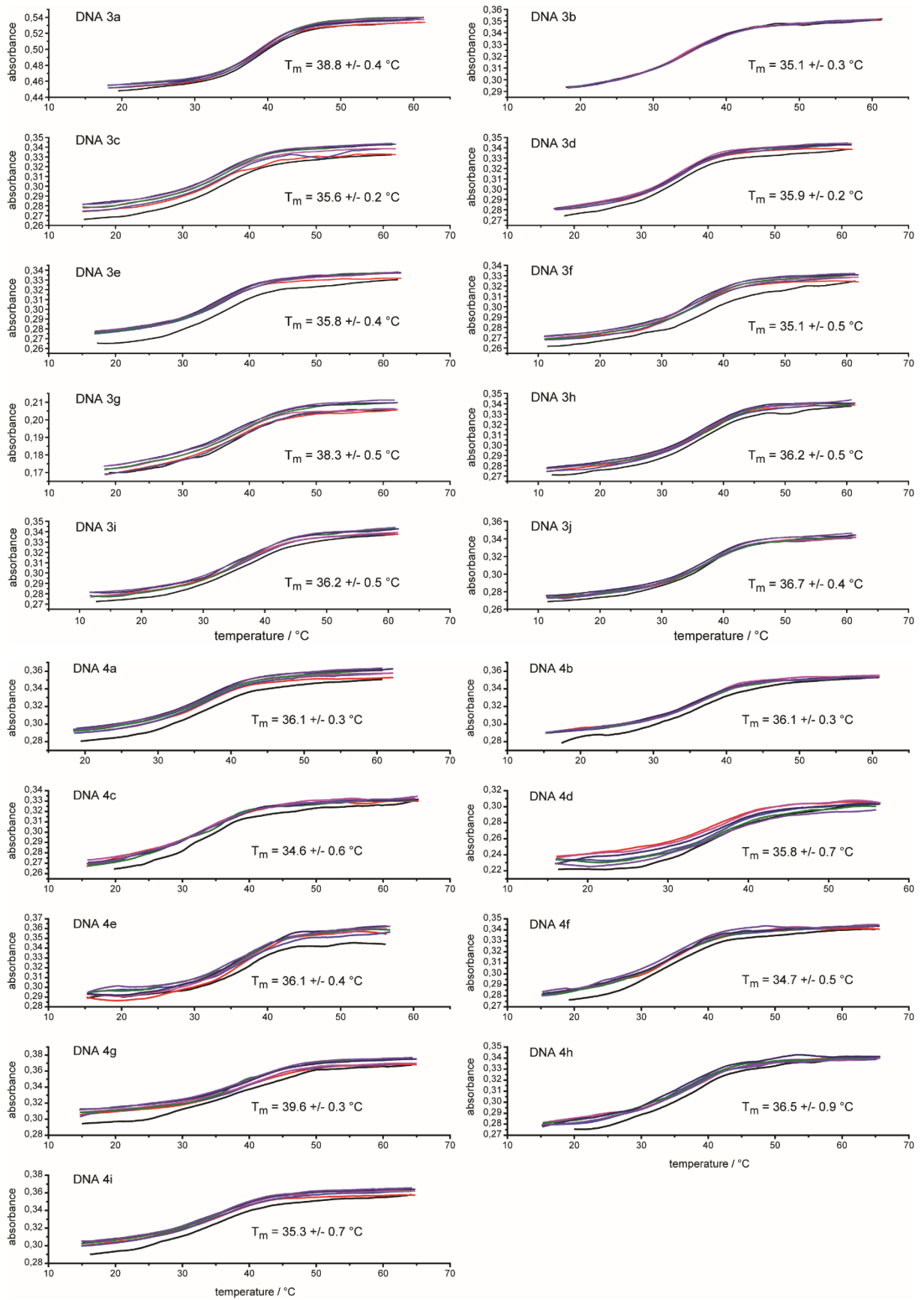
modifizierte DNA	Ausbeute	berechnete Masse [Da]	gemessen [Da]
<b>ODN 3b</b>	91%*	4953,0	4953,8
<b>ODN 3c</b>	68%	4967,0	4967,7
<b>ODN 3d</b>	62%	4981,0	4981,4
<b>ODN 3e</b>	62%	4995,0	4995,7
<b>ODN 3f</b>	33%	5029,0	5029,8
<b>ODN 3g</b>	21%	5027,0	5027,7
<b>ODN 3h</b>	66%	5003,0	5003,7
<b>ODN 3i</b>	73%	5023,0	5023,7
<b>ODN 3j</b>	24%	4997,0	4997,7

\*Umsetzung von 20 nmol anstatt 5 nmol Startmaterial

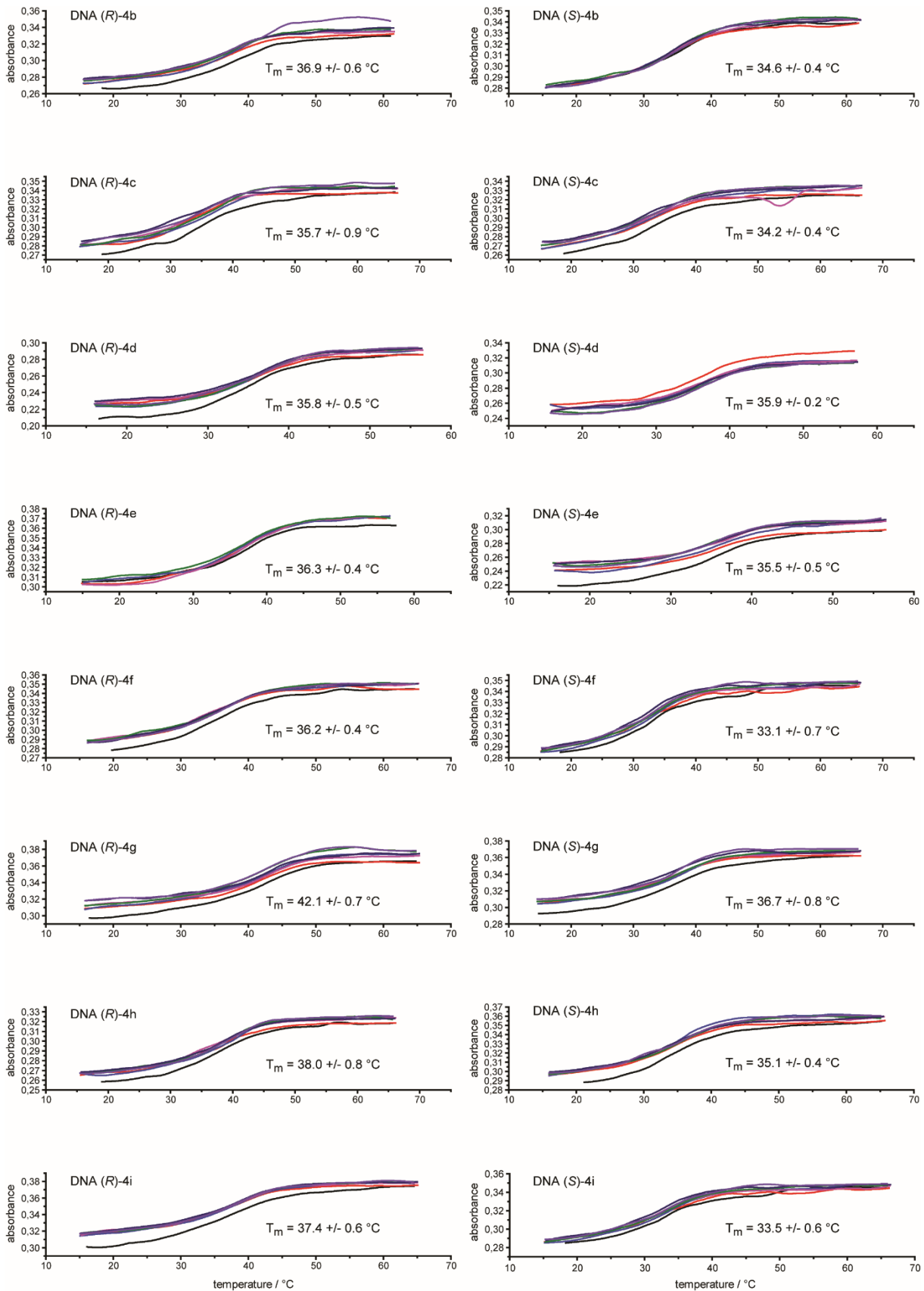


modifizierte DNA	Ausbeute	berechnete Masse [Da]	gemessen [Da]
<b>ODN 4b</b>	59%	5047,1	5046,7
<b>ODN 4c</b>	66%	5061,1	5060,8
<b>ODN 4d</b>	61%	5075,1	5074,8
<b>ODN 4e</b>	64%	5089,1	5088,8
<b>ODN 4f</b>	45%	5123,1	5122,7
<b>ODN 4g</b>	49%	5121,1	5120,7
<b>ODN 4h</b>	68%	5097,1	5096,7
<b>ODN 4i</b>	63%	5117,1	5116,8





**Abb. 97** Temperaturabhängige UV/Vis-Spektroskopie (Schmelzkurven) der sperrig substituierten photolabilen Oligonukleotide ODN **3a-j** und **4a-i** (1  $\mu$ M sense und antisense-Strang in 1xPBS-Puffer) ( $n = 7$ ).

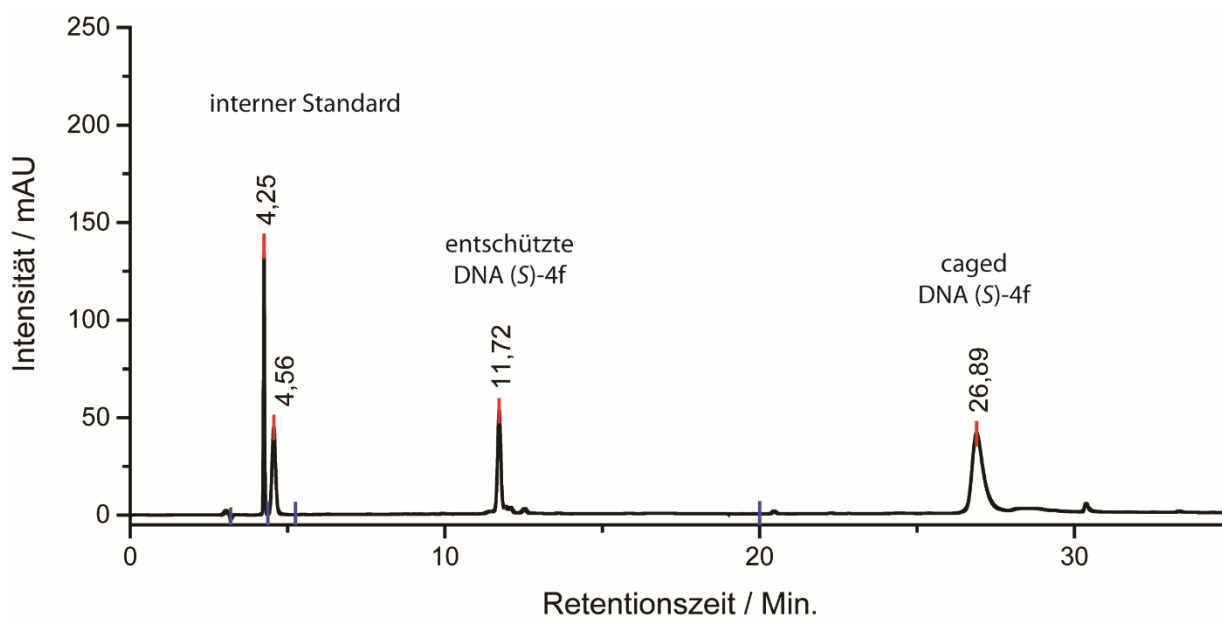


**Abb. 98** Temperaturabhängige UV/Vis-Spektroskopie (Schmelzpunktkurven) der sperrig substituierten photolabilen DEACBY-Oligonukleotide ODN **4a-i** (1  $\mu$ M sense und antisense-Strang in 1xPBS-Puffer) ( $n = 7$ ) in (S)- und (R)-Konfiguration.

### Quantenausbeutebestimmung

Photolabil geschützte DNA wurde in einer Küvette (13  $\mu\text{l}$  Volumen) für unterschiedliche Belichtungsdauern mit einer LED ( $\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$  oder  $405 \text{ nm}$ ) belichtet. Das Probevolumen enthielt typischerweise  $16,9 \mu\text{M}$  DNA mit einem Aliquot eines internen Standards (Uridin/Uracil). Die emittierte Photonenzahl  $q$  der LEDs wurde zunächst mithilfe eines Ferrioxalat-Actinometers nach Literaturvorschrift<sup>[129,130]</sup> bestimmt. Nach Bestrahlung der DNA-Proben wurden die Photolyse mittels RP-HPLC analysiert (Gradient A, MultoKrom 100-5 C18). Der Anteil von Startmaterial und von Photolyseprodukt wurde durch Peak-Integration ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen. Aus der Steigung  $\frac{dn_u}{dt}$  zum Zeitpunkt  $t = 0 \text{ s}$  (erhalten durch monoexponentiellen Fit der experimentellen Daten und Bestimmung der ersten Ableitung) wurde die Quantenausbeute gemäß Formel (6) bestimmt:

$$\Phi = \frac{dn_u}{q(1 - 10^{-A})dt} \quad (6)$$



**Abb. 99** Exemplarisches RP-HPLC Chromatogramm zur Quantifizierung der Photolyse von DNA (S)-4f (Belichtungszeit = 300 s bei 405 nm, 47 mW).

### Durchführung der Molekulardynamik-Simulationen

#### Simulations-Setup

Die initialen dsDNA-Strukturen (5'-GCATAAATAAGGTG-3') wurden mit Hilfe des Nucleic Acid Builder (NAB)<sup>[161]</sup> erzeugt (bereitgestellt auf <http://structure.usc.edu/make-na/server.html>). Unter der Annahme, dass sich die Kraftfeldparameter des Zuckergerüsts und des Phosphat-

Rückgrats nicht signifikant zwischen nativer und photolabil geschützter DNA unterscheiden, wurden nur die Nukleobasen und die photolabilen Schutzgruppen parametrisiert. Die photolabilen Schutzgruppenstrukturen wurden mit Hilfe der Software Chemcraft (<http://www.chemcraftprog.com> Version 1.8 (Build 164)) erzeugt, wobei das Zuckergerüst näherungsweise durch eine Methylgruppe<sup>[162]</sup> substituiert wurde. Die Geometrieoptimierung wurde mit der Software Gaussian09 mit HF/6-31G\* Methode und Basissatz durchgeführt. Atome der neuen Substituenten (Nukleobase mit Schutzgruppe) wurden gemäß General AMBER Force Field (GAFF)<sup>[163]</sup> Atomtypen zugeordnet. Die Partialladungen wurden mittels Restrained Electrostatic Potential Fit (RESP) berechnet, welcher in RESP ESP charge Drive (R.E.D.) Tools Version III.52 implementiert ist.<sup>[164]</sup> Die Methylgruppe wurde entfernt und die Partialladungen gleichmäßig über die verbliebenen Atome verteilt, wobei sichergestellt wurde, dass der so erhaltene Baustein aus Phosphat, Zucker, Nukleobase und Schutzgruppe eine Gesamtladung von -1 erhält. Das System wurde mit Hilfe des tleap Moduls (AMBER 14) erzeugt. Der neu parametrisierte Baustein wurde kovalent an die native DNA-Struktur angeknüpft. Die nativen DNA-Elemente wurden durch das parm99 Kraftfeld mit bsc1-Modifikation (parmbc1<sup>[149]</sup>) beschrieben. Die modifizierte Nukleobase wurde mit GAFF beschrieben. Parameter für Übergangsbereiche (z.B. zwischen natürlichem Zucker und photolabil geschützter Nukleobase) wurden aus dem bsc1-Kraftfeld entnommen und den entsprechenden parmbc1 und GAFF Atomtypen zugeordnet. Die modifizierte DNA wurde solvatisiert in einer abgeschnittenen oktahedralen Box mit einem TIP3P-Wassermodell mit einem Abstand von 15 Å in jede Richtung. Das System wurde neutralisiert und eine Salzkonzentration von 160 mM NaCl wurde dem System hinzugefügt. Daraus resultierte eine periodische Box aus ca. 37040 Atomen (1017 DNA+Cage, 63 Na<sup>+</sup>, 35 Cl<sup>-</sup> und 35925 Wasseratome).

### Energieminimierung

Es wurde ein dreistufiges Minimierungsprotokoll durchgeführt, um sterische Konflikte zu vermeiden: Das System wurde anfangs durch 500 Schritte Gradientenverfahren (Verfahren des steilsten Abstieges) minimiert, gefolgt von 500 Schritten gemäß Verfahren des konjugierten Gradienten. Die Berechnungen wurden unter konstantem Druck durchgeführt mit einem Cut-Off von 12 Å für nicht-bindende Wechselwirkungen und Positions-Restraints für die modifizierte DNA mit einer Kraftkonstante von 500 kcal/(mol\*Å<sup>2</sup>). Im zweiten Schritt wurden die Position-Restraints der photolabilen Schutzgruppe entfernt und dasselbe Protokoll wurde wie zuvor beschrieben angewendet. Schließlich wurde eine Minimierung ohne Restraints über 1000 Schritte nach Gradientenverfahren und daraufhin 1500 Schritte nach Verfahren des konjugierten Gradienten durchgeführt.

## Equilibrierung

1. Ausgehend von den Koordinaten der letzten Minimierung wurde eine 100 ps Equilibrierung (Zeitintervall von 2 fs) durchgeführt. Zufallsgeschwindigkeiten wurden gemäß Boltzmann-Verteilung erzeugt. Das System wurde daraufhin unter Verwendung von Langevin Dynamik mit einer Kollisionsfrequenz von 1/ps unter konstantem Volumen langsam von 0 K auf 300 K aufgeheizt. Wasserstoff-Atome wurden eingeschränkt mit dem SHAKE Algorithmus und ein Cut-Off für nicht-bindende Wechselwirkungen von 12 Å wurde angewendet. Es wurden schwache Positions-Restraints für die DNA+Schutzgruppen-Atome mit einer Kraftkonstante von 10 kcal/(mol\*Å<sup>2</sup>) angewendet.
2. Es wurde eine 500 ps Equilibrierung mit den Koordinaten, Geschwindigkeiten und Boxinformationen aus der vorherigen Equilibrierung durchgeführt. Mittels Langevin Dynamik (Kollisionsfrequenz 1/ps) wurde die Temperatur konstant auf 300 K gehalten. Da Langevin Dynamiken häufig zu „Synchronisations“-Artefakten<sup>[165,166]</sup> neigen, wurde ein zufälliger Anfangswert zu Beginn der Neuberechnung gesetzt. Ein durchschnittlicher Druck von 1 atm. wurde aufrechterhalten (zentrische Streckung der Koordinaten, Relaxationszeit von 2 ps). Wasserstoff-Atome wurden mit dem SHAKE Algorithmus eingeschränkt und ein Cut-Off für nicht-bindende Wechselwirkungen von 12 Å wurde angewendet.

## MD-Simulationen

Für jede modifizierte DNA wurden zehn unabhängige Simulationen á 200 ns durchgeführt. Die kumulative Gesamtsimulationszeit beträgt daher jeweils 2 µs. Die Trajektorien wurden in 10 ns-Intervallen simuliert, wobei die Koordinaten, Geschwindigkeiten und Boxinformationen jeweils vom vorherigen Durchlauf übernommen wurden, während zufällige Anfangswerte bei jedem Restart gewählt wurden, um „Synchronisations-Artefakte“ zu vermeiden. Die Koordinaten aus den Restart- und Trajektorien-Dateien wurden in die Primärbox „gepackt“. Mittels Langevin Dynamik (Kollisionsfrequenz 1/ps) wurde die Temperatur konstant auf 300 K gehalten. Ein durchschnittlicher Druck von 1 atm. wurde aufrechterhalten mit zentrischer Streckung der Koordinaten und einer Relaxationszeit von 2 ps. Wasserstoff-Atome wurden mit dem SHAKE Algorithmus eingeschränkt und ein Cut-Off für nicht-bindende Wechselwirkungen von 12 Å wurde angewendet.

## Clustering

Jede Trajektorie wurde mit Hilfe des gromos Algorithmus<sup>[167]</sup>, implementiert im GROMACS (5.0.6)-Programm g\_cluster, in Cluster aufgeteilt. Die Strukturen der photolabil geschützten Reste inklusive der benachbarten Nukleobasen desselben und des gegenüberliegenden

Stranges (insgesamt 6 Residuen) wurden nach der Methode des kleinsten Quadrates gefittet und ein RMSD berechnet. Der Cut-Off wurde auf 1,25 Å gesetzt und die zentrale Struktur jedes Clusters wurde abgespeichert.

## 5. Anhang

### 5.1 Literaturverzeichnis

- [1] J. A. Barltrop, P. Schofield, *Tetrahedron Lett.* **1962**, 3, 697–699.
- [2] D. H. R. Barton, Y. L. Chow, A. Cox, G. W. Kirby, *Tetrahedron Lett.* **1962**, 3, 1055–1057.
- [3] X. Ai, J. Mu, B. Xing, *Theranostics* **2016**, 6, 2439–2457.
- [4] K. C. Nicolaou, C. W. Hummel, M. Nakada, K. Shibayama, E. N. Pitsinos, H. Saimoto, Y. Mizuno, K. U. Baldenius, A. L. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7625–7635.
- [5] J. Li, S. Jeong, L. Esser, P. G. Harran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4765–4769.
- [6] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* **2002**, 1, 441–58.
- [7] Y. V. Il'ichev, M. A. Schwörer, J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4581–4595.
- [8] T. Schmierer, S. Laimgruber, K. Haiser, K. Kiewisch, J. Neugebauer, P. Gilch, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 15653.
- [9] A. Specht, M. Goeldner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 2008–2012.
- [10] A. Hasan, K.-P. Stengele, H. Giegrich, P. Cornwell, K. R. Isham, R. A. Sachleben, W. Pfeleiderer, R. S. Foote, *Tetrahedron* **1997**, 53, 4247–4264.
- [11] S. Walbert, W. Pfeleiderer, U. E. Steiner, *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 1601–1611.
- [12] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2006**, 3, 35–40.
- [13] A. Specht, F. Bolze, L. Donato, C. Herbivo, S. Charon, D. Warther, S. Gug, J.-F. Nicoud, M. Goeldner, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, 11, 578–586.
- [14] L. Donato, A. Mourrot, C. M. Davenport, C. Herbivo, D. Warther, J. Léonard, F. Bolze, J.-F. Nicoud, R. H. Kramer, M. Goeldner, et al., *Angew. Chem.* **2012**, 124, 1876–1879.
- [15] S. Gug, F. Bolze, A. Specht, C. Bourgogne, M. Goeldner, J.-F. Nicoud, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 9525–9529.
- [16] H. K. Agarwal, R. Janicek, S.-H. Chi, J. W. Perry, E. Niggli, G. C. R. Ellis-Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, DOI 10.1021/jacs.5b11606.
- [17] R. S. Givens, B. Matuszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 6860–6861.
- [18] B. Schade, V. Hagen, R. Schmidt, R. Herbrich, E. Krause, T. Eckardt, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 9109–9117.
- [19] T. Eckardt, V. Hagen, B. Schade, R. Schmidt, C. Schweitzer, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 703–710.
- [20] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, 113, 119–191.
- [21] J. E. T. Corrie, T. Furuta, R. Givens, A. L. Yousef, M. Goeldner, in *Dyn. Stud. Biol.* (Eds.: M. Goeldner, R.S. Givens), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, **2005**, pp. 1–94.

- [22] B. Sauerwein, G. B. Schuster, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 1903–1906.
- [23] H. Takano, T. Narumi, W. Nomura, T. Furuta, H. Tamamura, *Org. Lett.* **2015**, 151015101757009.
- [24] L. Fournier, C. Gauron, L. Xu, I. Aujard, T. Le Saux, N. Gagey-Eilstein, S. Maurin, S. Dubrulle, J.-B. Baudin, D. Bensimon, et al., *ACS Chem. Biol.* **2013**, 130507122943006.
- [25] J. P. Olson, M. R. Banghart, B. L. Sabatini, G. C. R. Ellis-Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15948–15954.
- [26] N. Kotzur, B. Briand, M. Beyermann, V. Hagen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16927–16931.
- [27] M. M. Mahmoodi, S. A. Fisher, R. Y. Tam, P. C. Goff, R. B. Anderson, J. E. Wissinger, D. A. Blank, M. S. Shoichet, M. D. Distefano, *Org Biomol Chem* **2016**, *14*, 8289–8300.
- [28] A. M. Smith, M. C. Mancini, S. Nie, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 710–711.
- [29] L. Zayat, C. Calero, P. Alborés, L. Baraldo, R. Etchenique, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 882–883.
- [30] T. Respondek, R. N. Garner, M. K. Herroon, I. Podgorski, C. Turro, J. J. Kodanko, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17164–17167.
- [31] N. J. Farrer, J. A. Woods, L. Salassa, Y. Zhao, K. S. Robinson, G. Clarkson, F. S. Mackay, P. J. Sadler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8905–8908.
- [32] S. Bonnet, B. Limburg, J. D. Meeldijk, R. J. M. K. Gebbink, J. A. Killian, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 252–261.
- [33] T. A. Shell, D. S. Lawrence, *Acc. Chem. Res.* **2015**, 151019103736005.
- [34] Z. L. Rodgers, T. A. Shell, A. M. Brugh, H. L. Nowotarski, M. D. E. Forbes, D. S. Lawrence, *Inorg. Chem.* **2016**, DOI 10.1021/acs.inorgchem.5b02036.
- [35] E. Palao, T. Slanina, L. Muchová, T. Šolomek, L. Víttek, P. Klán, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 126–133.
- [36] P. P. Goswami, A. Syed, C. L. Beck, T. R. Albright, K. M. Mahoney, R. Unash, E. A. Smith, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3783–3786.
- [37] N. Rubinstein, P. Liu, E. W. Miller, R. Weinstain, *Chem Commun* **2015**, *51*, 6369–6372.
- [38] A. P. Gorka, R. R. Nani, M. J. Schnermann, *Org Biomol Chem* **2015**, *13*, 7584–7598.
- [39] A. P. Gorka, M. J. Schnermann, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *33*, 117–125.
- [40] A. P. Gorka, R. R. Nani, J. Zhu, S. Mackem, M. J. Schnermann, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14153–14159.
- [41] R. R. Nani, A. P. Gorka, T. Nagaya, T. Yamamoto, J. Ivanic, H. Kobayashi, M. J. Schnermann, *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3*, 329–337.
- [42] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8572–8604.
- [43] K. Nakanishi, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2016**, *7*, 637–660.



- [44] Z. Vaníková, M. Hocek, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 6852–6855.
- [45] H. Ando, T. Furuta, R. Tsien Y., H. Okamoto, *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 317–325.
- [46] L. Wu, F. Pei, J. Zhang, J. Wu, M. Feng, Y. Wang, H. Jin, L. Zhang, X. Tang, *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 12114–12122.
- [47] P. Ordoukhanian, J.-S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9570–1.
- [48] A. Dussy, C. Meyer, E. Quennet, T. A. Bickle, B. Giese, A. Marx, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 54–60.
- [49] M. E. Schwartz, R. R. Breaker, G. T. Asteriadis, J. S. deBear, G. R. Gough, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1019–1024.
- [50] S. G. Chaulk, A. M. MacMillan, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3173–3178.
- [51] T. I. Lee, R. A. Young, *Cell* **2013**, *152*, 1237–1251.
- [52] D. D. Young, H. Lusic, M. O. Lively, J. A. Yoder, A. Deiters, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2937–2940.
- [53] J. B. Preall, Z. He, J. M. Gorra, E. J. Sontheimer, *Curr. Biol.* **2006**, *16*, 530–535.
- [54] R. Rupaimoole, F. J. Slack, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 203–222.
- [55] F. Schäfer, J. Wagner, A. Knau, S. Dimmeler, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13558–13561.
- [56] A. Bonauer, G. Carmona, M. Iwasaki, M. Mione, M. Koyanagi, A. Fischer, J. Burchfield, H. Fox, C. Doebele, K. Ohtani, et al., *Science* **2009**, *324*, 1710–1713.
- [57] T. Lucas, F. Schäfer, P. Müller, S. A. Eming, A. Heckel, S. Dimmeler, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15162.
- [58] J. M. Govan, D. D. Young, H. Lusic, Q. Liu, M. O. Lively, A. Deiters, *Nucleic Acids Res.* **2013**, DOI 10.1093/nar/gkt806.
- [59] J. L. Richards, G. K. Seward, Y.-H. Wang, I. J. Dmochowski, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 320–324.
- [60] X. Wang, M. Feng, L. Xiao, A. Tong, Y. Xiang, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 444–451.
- [61] D. D. Young, M. O. Lively, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6183–6193.
- [62] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman And Company, New York, **2013**.
- [63] L. Cartegni, S. L. Chew, A. R. Krainer, *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 285–298.
- [64] J. Tazi, S. Durand, P. Jeanteur, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 469–478.
- [65] J. Hemphill, Q. Liu, R. Uprety, S. Samanta, M. Tsang, R. L. Juliano, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3656–3662.
- [66] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1992**, *355*, 850–852.
- [67] M. N. Stojanovic, P. de Prada, D. W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4928–4931.
- [68] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564–566.

- [69] W. Tan, M. J. Donovan, J. Jiang, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2842–2862.
- [70] Q. Zhu, G. Liu, M. Kai, *Molecules* **2015**, *20*, 20979–20997.
- [71] K. Padmanabhan, A. Tulinsky, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1996**, *52*, 272–282.
- [72] A. Heckel, G. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 822–823.
- [73] A. Heckel, M. C. R. Buff, M. L. Raddatz, J. Müller, B. Pötzsch, G. Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6748–6750.
- [74] M. C. R. Buff, F. Schäfer, B. Wulffen, J. Müller, B. Pötzsch, A. Heckel, G. Mayer, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 2111–2118.
- [75] S. Sambandan, G. Akbalik, L. Kochen, J. Rinne, J. Kahlstatt, C. Glock, G. Tushev, B. Alvarez-Castelao, A. Heckel, E. M. Schuman, *Science* **2017**, *355*, 634–637.
- [76] C. Wang, Z. Zhu, Y. Song, H. Lin, C. J. Yang, W. Tan, *Chem. Commun. Camb. U. K.* **2011**, *47*, 5708–5710.
- [77] K. B. Joshi, A. Vlachos, V. Mikat, T. Deller, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2746–2748.
- [78] J. S. Rinne, T. P. Kaminski, U. Kubitscheck, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5375.
- [79] K. Hwang, P. Wu, T. Kim, L. Lei, S. Tian, Y. Wang, Y. Lu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13798–13802.
- [80] X. Tang, J. Swaminathan, A. M. Gewirtz, I. J. Dmochowski, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *36*, 559–569.
- [81] X. Ouyang, I. A. Shestopalov, S. Sinha, G. Zheng, C. L. W. Pitt, W.-H. Li, A. J. Olson, J. K. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13255–13269.
- [82] X. Tang, M. Su, L. Yu, C. Lv, J. Wang, Z. Li, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 3848–3855.
- [83] S. Yamazoe, I. A. Shestopalov, E. Provost, S. D. Leach, J. K. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6908–6911.
- [84] J. C. Gripenburg, T. L. Rapp, P. J. Carroll, J. Eberwine, I. J. Dmochowski, *Chem. Sci. R. Soc. Chem. 2010* **2015**, *6*, 2342–2346.
- [85] P. T. Gilham, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6212–6222.
- [86] R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3350–3355.
- [87] G. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes, D. M. Williams, Eds. , in *Nucleic Acids Chem. Biol.*, Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2007**, pp. 143–166.
- [88] R. L. Letsinger, J. L. Finnan, G. A. Heavner, W. B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3278–3279.
- [89] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859–1862.
- [90] D. C. Capaldi, H. Gaus, A. H. Krotz, J. Arnold, R. L. Carty, M. N. Moore, A. N. Scozzari, K. Lowery, D. L. Cole, V. T. Ravikumar, *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7*, 832–838.
- [91] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [92] A. Michael, *J Prakt Chem* **1893**, 94–95.

- [93] J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302.
- [94] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [95] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [96] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210–216.
- [97] L. Jin, D. R. Tolentino, M. Melaimi, G. Bertrand, *Sci. Adv.* **2015**, *1*, e1500304–e1500304.
- [98] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
- [99] P. S. Donnelly, S. D. Zanatta, S. C. Zammit, J. M. White, S. J. Williams, *Chem. Commun.* **2008**, 2459.
- [100] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260–3275.
- [101] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666–676.
- [102] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1388.
- [103] M. M. Haque, X. Peng, *Sci. China Chem.* **2014**, *57*, 215–231.
- [104] M. Fischler, A. Sologubenko, J. Mayer, G. Clever, G. Burley, J. Gierlich, T. Carell, U. Simon, *Chem Commun* **2008**, 169–171.
- [105] J. I. Cutler, D. Zheng, X. Xu, D. A. Giljohann, C. A. Mirkin, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 1477–1480.
- [106] S. R. Gerrard, C. Hardiman, M. Shelbourne, I. Nandhakumar, B. Nordén, T. Brown, *ACS Nano* **2012**, *6*, 9221–9228.
- [107] M. Nakahara, T. Kuboyama, A. Izawa, Y. Hari, T. Imanishi, S. Obika, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3316–3319.
- [108] P. Kočalka, N. K. Andersen, F. Jensen, P. Nielsen, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2106–2116.
- [109] T. Fujino, N. Yamazaki, A. Hasome, K. Endo, H. Isobe, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 868–870.
- [110] J. Qiu, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 6959.
- [111] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3958–3964.
- [112] X. Chen, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 7597.
- [113] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 15329–15334.
- [114] H. Xiong, F. Seela, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5584–5597.
- [115] J. Lietard, A. Meyer, J.-J. Vasseur, F. Morvan, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 191–200.
- [116] H. Yang, F. Seela, *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22*, 1435–1444.
- [117] M. Aigner, M. Hartl, K. Fauster, J. Steger, K. Bister, R. Micura, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 47–51.
- [118] M.-L. Winz, A. Samanta, D. Benzinger, A. Jäschke, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e78–e78.
- [119] C. Chowdhury, B. Das, S. Mukherjee, B. Achari, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 5108–5119.

- [120] P. Ghosh, A. Chattopadhyay, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 5202–5205.
- [121] P. Kumar, K. Lokanatha Rai, *Chem. Pap.* **2012**, *66*, DOI 10.2478/s11696-012-0195-6.
- [122] V. Sandgren, T. Agback, P.-O. Johansson, J. Lindberg, I. Kvarnström, B. Samuelsson, O. Belda, A. Dahlgren, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4377–4389.
- [123] R. O. Schönleber, J. Bendig, V. Hagen, B. Giese, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 97–101.
- [124] T. Weinrich, M. Gränz, C. Grünewald, T. F. Prisner, M. W. Göbel, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 491–496.
- [125] S. S. Pujari, H. Xiong, F. Seela, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8693–8696.
- [126] M. Andronesco, D. Dees, L. Slaybaugh, Y. Zhao, A. Condon, B. Cohen, S. Skiena, *Nat. Comput.* **2003**, *2*, 391–415.
- [127] S. Brenner, S. R. Williams, E. H. Vermaas, T. Storck, K. Moon, C. McCollum, J. I. Mao, S. Luo, J. J. Kirchner, S. Eletr, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 1665–1670.
- [128] I. P. Pozdnyakov, O. V. Kel, V. F. Plyusnin, V. P. Grivin, N. M. Bazhin, *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 8316–8322.
- [129] P. Klán, J. Wirz, *Photochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2009**.
- [130] A. Rodrigues-Correia, P. Seyfried, A. Heckel, in *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, John Wiley & Sons, Inc., **2014**.
- [131] P. K. Jain, D. Karunakaran, S. H. Friedman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1404–1409.
- [132] J. E. House, *Principles of Chemical Kinetics.*, Elsevier, Burlington, **2007**.
- [133] S. Y. Wang, Ed., *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*, Academic Press, New York, **1976**.
- [134] M. L. Raddatz, A. Dolf, E. Endl, P. Knolle, M. Famulok, G. Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5190–5193.
- [135] F. Opazo, L. Eiden, L. Hansen, F. Rohrbach, J. Wengel, J. Kjems, G. Mayer, *Mol. Ther. Acids* **2015**, *4*, e251.
- [136] M. Koutsioumpa, E. Papadimitriou, *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* **2014**, *9*, 137–152.
- [137] C. Höbartner, S. K. Silverman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7305–7309.
- [138] R. A. Boon, K. Iekushi, S. Lechner, T. Seeger, A. Fischer, S. Heydt, D. Kaluza, K. Trüger, G. Carmona, A. Bonauer, et al., *Nature* **2013**, *495*, 107–110.
- [139] A. Rigo, A. Corazza, M. Luisa di Paolo, M. Rossetto, R. Ugolini, M. Scarpa, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1495–1501.
- [140] L. Kröck, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 475–477.
- [141] H. S. Steinert, F. Schäfer, H. R. A. Jonker, A. Heckel, H. Schwalbe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1072–1075.

- [142]A. Stephen, K. Hashmi, J. W. Bats, J.-H. Choi, L. Schwarz, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7491–7494.
- [143]L. R. Reddy, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1142–1145.
- [144]P. Jain, H. Wang, K. N. Houk, J. C. Antilla, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1391–1394.
- [145]M. Klussmann, L. Ratjen, S. Hoffmann, V. Wakchaure, R. Goddard, B. List, *Synlett* **2010**, *2010*, 2189–2192.
- [146]T. R. Hoye, C. S. Jeffrey, F. Shao, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2451–2458.
- [147]A. Rodrigues-Correia, D. Knapp-Bühle, J. W. Engels, A. Heckel, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5128–5131.
- [148]A. Rodrigues-Correia, X. M. M. Weyel, A. Heckel, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5500–5503.
- [149]I. Ivani, P. D. Dans, A. Noy, A. Pérez, I. Faustino, A. Hospital, J. Walther, P. Andrio, R. Goñi, A. Balaceanu, et al., *Nat. Methods* **2015**, DOI 10.1038/nmeth.3658.
- [150]J. A. Baccile, M. A. Morrell, R. M. Falotico, B. T. Milliken, D. L. Drew, F. M. Rossi, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 1933–1935.
- [151]A. Gandioso, S. Contreras, I. Melnyk, J. Oliva, S. Nonell, D. Velasco, J. García-Amorós, V. Marchán, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 5398–5408.
- [152]J. R. Quinn, S. C. Zimmerman, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7459–7467.
- [153]A. S. Kiselyov, T. Steinbrecher, R. G. Harvey, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6129–6134.
- [154]P. Potier, A. Abdennaji, J.-P. Behr, *Chemistry* **2000**, *6*, 4188–4194.
- [155]S. Lal, H. S. Rzepa, S. Díez-González, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 2274–2287.
- [156]J. Maury, L. Feray, M. P. Bertrand, A. Kapat, P. Renaud, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 9606–9611.
- [157]T. Suzuki, Y. Ota, Y. Kasuya, M. Mutsuga, Y. Kawamura, H. Tsumoto, H. Nakagawa, M. G. Finn, N. Miyata, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6817–6820.
- [158]M. Lamani, K. R. Prabhu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6622–6625.
- [159]J. Tummatorn, C. Thongsornkleeb, S. Ruchirawat, T. Gettongsong, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1463.
- [160]E. L. Myers, R. T. Raines, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2359–2363.
- [161]T. J. Macke, D. A. Case, in *Mol. Model. Nucleic Acids* (Eds.: N.B. Leontis, J. SantaLucia), American Chemical Society, Washington, DC, **1997**, pp. 379–393.
- [162]V. Mlýnský, P. Banáš, D. Hollas, K. Réblová, N. G. Walter, J. Šponer, M. Otyepka, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 6642–6652.
- [163]J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157–1174.
- [164]F.-Y. Dupradeau, A. Pigache, T. Zaffran, C. Savineau, R. Lelong, N. Grivel, D. Lelong, W. Rosanski, P. Cieplak, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 7821.
- [165]B. P. Uberuaga, M. Anghel, A. F. Voter, *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 6363–6374.

- [166]D. J. Sindhikara, S. Kim, A. F. Voter, A. E. Roitberg, *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 1624–1631.
- [167]X. Daura, K. Gademann, B. Jaun, D. Seebach, W. F. van Gunsteren, A. E. Mark, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 236–240.

## 5.2 Abkürzungsverzeichnis

ABI	<i>Applied Biosystems</i>
Ac	Acetyl-
AFM	Atomic Force Microscopy (deutsch: Rasterkraftmikroskop)
AMB	1,4-Bis(azidomethyl)benzol
AMBER	Assisted Model Building with Energy Refinement
BCMAMC	{7-[Bis(carboxymethyl)amino]cumarin-4-yl}methyl-
Bhc	6-Brom-4-(1,2-dihydroxyethyl)-7-hydroxycumarin-
BINOL	1,1'-Bi-2-naphthol
BODIPY	Borondipyrrromethene
bsp.	beispielsweise
BTNPE	2-(1-Benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)-1-(2-nitrophenyl)ethyl-
BTT	5-(Benzylthio)-1 <i>H</i> -tetrazol
Bz	Benzyl-
BTES	2-(4-((bis((1-tert-butyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)ethylhydrogensulfat
ca.	circa
CEO	$\beta$ -Cyanoethyloxid
CHARMM	Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics
CON	cyclic oligonucleotide (deutsch: zyklisches Oligonukleotid)
COSY	correlation spectroscopy
CPG	controlled pore glass
CuAAC	Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEA	Diethylamin
DEACM	7-Diethylaminocumarin
DEACBY	7-Diethylaminocumarinbut-3-in-1-ol
DEACPY	Diethylaminocumarinprop-2-in-1-ol
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAMC	7-Dimethylaminocumarin

---

DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMFDMA	N,N-Dimethylformamid-dimethylacetal
DMI	1,3-Dimethyl-2-imidazolidinone
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTrCl	Dimethoxytritylchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPMTC	Diphenylmethyltriazolcumarin
DPPA	Diphenylphosphorylazid
Ds	double stranded (deutsch: doppelsträngig)
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDITH	3-Ethoxy-1,2,4-dithiazolin-5-on
ESI-MS	Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie
et al.	et alii (deutsch: "und andere")
EtOH	Ethanol
ETT	5-(Ethylthio)-1 <i>H</i> -tetrazol
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GM	Göppert-Mayer
ggü.	gegenüber
HCM	7-Hydroxycumarin
HeLa	Henrietta Lacks
HEK	Human Embryonic Kidney
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Ihc	6-Iod-7-hydroxycumarin
iPrPac	<i>para</i> -iso-Propylphenoxyacetyl-
LNA	locked nucleic acid
LUMO	Lowest Occupied Molecular Orbital
MCM	7-Methoxycumarin
MD	Molekulardynamik
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
miR/miRNA	microRNA
mRNA	messengerRNA



---

MsCl	Mesylchlorid
NDBF	Nitrodibenzofuran
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (deutsch: Kernspinresonanz)
NPE	1-(2-Nitrophenyl)ethyl-
NPEOC	<i>ortho</i> -Nitro-2-phenethyloxycarbonyl
NPOM	6-Nitropiperonyloxymethyl
NPBY	1-(2-Nitrophenyl)but-3-in-1-ol
NPP	2-( <i>o</i> -Nitrophenyl)-propyl
NPPY	1-(2-Nitrophenyl)prop-2-in-1-ol
nt	nucleotide (deutsch: Nukleotid)
<i>o</i> -NB	<i>ortho</i> -Nitrobenzyl-
ODN	Oligodesoxynukleotid
OPLS	Optimized Potentials for Liquid Simulations
p.a.	pro analysi
PALM	Photo-activated localization microscopy
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein-Datenbank
PEG	Polyethylenglykol
pHP	<i>para</i> -Hydroxyphenacyl-
PNA	Peptid-Nukleinsäure
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
siRNA	small interfering RNA
SPAAC	strain-promoted azide-alkyne cycloaddition
ss	single stranded (deutsch: einzelsträngig)
SSO	Splice-switching Oligonukleotide
Tac	<i>para-tert</i> -Butylphenoxyacetyl-
TBAF	<i>tetra</i> -Butylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
TD-DFT	Time-Dependent Density Functional Theory
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran

THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolymethyl)amin
TIPSCI	Triisopropylbenzylsulfonylchlorid
TRIP	3,3'-Bis(2,4,6-triisopropylphenyl)-1,1'-binaphthyl-2,2'- diylhydrogenphosphat
tRNA	Transfer-RNA
TsCl	Tosylchlorid
u.a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region
UV/Vis	Ultraviolett/Visible
z.B.	zum Beispiel

### 5.3 Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne das Zutun vieler Menschen vielleicht niemals zustande gekommen. Das Glück, das ich darüber empfinde, lässt sich auf zwei Seiten Papier lediglich andeuten!

Allem voran möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Alexander Heckel für die Aufnahme in den Arbeitskreis und in das spannende Forschungsgebiet der photoaktivierbaren Nukleinsäuren bedanken. Für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die zugestandene wissenschaftliche Freiheit und die fachliche und vor allem auch persönliche Betreuung bin ich sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. Harald Schwalbe und Frau Jr. Prof. Nina Morgner möchte ich für die produktive Betreuung als Mentoren im Rahmen des CLiC-Graduiertenkollegs danken. Herrn Prof. Dr. Harald Schwalbe möchte ich darüber hinaus für die hilfreiche Diskussion während der Ausarbeitung meines Promotionsthemas danken, sowie für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Joachim Engels möchte ich mich für das Engagement im Rahmen meiner Bewerbung für das Maincampus-Stipendium bedanken, sowie für die hilfreichen fachlichen Gespräche und Anekdoten.

Herrn Prof. Dr. Günter Mayer und Laura Eiden möchte ich für die erfolgreiche Kollaboration danken. Ebenfalls für die ausdauernde und gute Zusammenarbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Gerhard Hummer, Dr. Lukas Stelzl und Marcel Heinz danken, sowie György Pintér aus dem Arbeitskreis Schwalbe und Dean Klötzner.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen (ehemaligen) Mitgliedern des Arbeitskreises Heckel für die tolle Zeit in den letzten beinahe 5 Jahren bedanken. Vielen Dank für die zahlreichen lustigen und manchmal absurd-komischen Diskussionen, die wir gemeinsam hatten! Ein großes Dankeschön an Xenia Weyel, mit der ich das Labor B412 nach unserem Umzug aus dem BMLS einrichten durfte und die mich von da an immer wieder zum Einhalten eines gewissen Sauberkeitslevels in unserem gemeinsamen Abzug motivierte. Danke auch meinen weiteren Laborkollegen Nikolai Grebenovsky und insbesondere Matīss Reinfelds für die vielen guten fachlichen und persönlichen Gespräche, die gute Musik und Atmosphäre in unserem Labor und die unentwegten Bemühungen, etwas Gutes für die Umwelt zu tun! Ich hätte mir keine besseren Laborkollegen wünschen können!

Dr. Manuela Fichte, Dr. Florian Schäfer, Dr. Christian Grünewald, Dr. Lena Wicke, Dr. Felix Friedrich, Dr. Hi-jea Cha, Dr. Tomáš Slanina und Dr. Jennifer Rinne möchte ich dafür danken, dass sie als Ansprechpartner immer ein offenes Ohr und guten Rat hatten, was mir vor allem in der Anfangszeit sehr geholfen hat. Allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern der Mensa-Boycott-Gruppe möchte ich für die Freundschaft und die schönen gemeinsamen Stunden in

und außerhalb der Universität über die letzten Jahre danken (allen voran Dr. Manuela Fichte, Josefine Kahlstatt, Xenia Weyel, Patricia Müller, Yvonne Becker). Dr. Manuela Fichte und Patricia Müller danke ich darüber hinaus für das Korrekturlesen der Dissertation. Ein großes Dankeschön auch an Thomas Goldau für die gemeinsamen Stunden, die Hilfsbereitschaft und die vielen fachlichen Diskussionen seit unserer Zeit im BMLS. Martin Held, Alexandra Schuck und Heike Köhler möchte ich für die große technische und organisatorische Unterstützung, sowie für die vielen schönen Gespräche danken. Ein Dankeschön außerdem an die Serviceabteilungen Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie. Vielen Dank an Herrn Dr. Uwe Hener, Andreas Münch, Matthias Brandl und Ilona Prieß für die schnell ausgeführten Auftragsmessungen. Ich danke ebenfalls allen Mitarbeitern der Chemikalienausgabe und -entsorgung (insbesondere Julia Kiedrowski, Ralf Salomon, Wilhelm Lohbeck und Keve Bitto). Dr. Christian Grünwald möchte ich darüber hinaus für sein großes Engagement und die Zusammenarbeit im CLiC Graduiertenkolleg, sowie für die zahlreichen anregenden (auch politischen) Diskussionen danken. Ich danke allen Mitgliedern von CLiC für die schöne gemeinsame Zeit, insbesondere Heidi Zetzsche für die gute Zusammenarbeit im CLiC-Sprecherteam. Lisa-Marie Herzig, Alexandra Gresika und Deniz Ar möchte ich darüber hinaus für die vielen tollen Momente während des Studiums danken.

Ich danke meiner ehemaligen Lehrerin Frau Anne Schröder-Habbel für den ausgezeichneten Chemie-Unterricht, der mich zum Studium der Chemie motivierte. Herrn Frank Paetzke danke ich für die wichtige Unterstützung und die Zusammenarbeit während Schule und Studium.

Weiterer Dank gilt meinen Bachelorstudenten Dominik Scheliu, Anja Blümler und Johanna Ehrler, sowie meinen Masterpraktikanten Mathias Bolz, Volker Hermanns, Yvonne Becker und Alexander Balinovic.

Den größten Dank möchte ich schließlich meinen Eltern, meinen beiden Geschwistern Jasmin und Oliver und meinen Freunden aussprechen, die mich in den vergangenen Jahren bedingungslos begleitet, unterstützt, motiviert und nicht selten aufgemuntert haben. Besonderen Dank an Marcel Hummel, sowie Dario Faraci, Jessica Fields, Theresa Hütteroth, Hee-In Jung, Kim Kannler, Yessica Vásquez und Claudia Wechselberger.

## 5.4 Lebenslauf



### PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

---

Name:		Patrick Seyfried
geboren am	28.02.1989	in Frankfurt am Main
Familienstand		ledig
Staatsangehörigkeit		deutsch

### SCHULISCHER UND AKADEMISCHER WERDEGANG

---

4/2014 - 9/2017	Promotion bei Prof. Dr. Alexander Heckel an der Goethe-Universität Frankfurt am Main  <i>Titel der Dissertation:</i> Synthese und Untersuchung photoaktivierbarer zyklischer Oligonukleotide und sterisch anspruchsvoller photolabiler Schutzgruppen
4/2012 - 3/2014	Johann Wolfgang von Goethe-Universität Frankfurt Hilfswissenschaftler am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie in der Lehre
10/2011 - 12/2013 Abschluss:	Johann Wolfgang von Goethe-Universität Frankfurt Master of Science in Chemie (Abschlussnote: 1,0 mit Auszeichnung)  <i>Thema der Masterarbeit:</i> Cumarine als photolabile Schutzgruppen von RNA-Nukleobasen
10/2008 - 1/2012 Abschluss:	Johann Wolfgang von Goethe-Universität Frankfurt Bachelor of Science in Chemie (Abschlussnote: 1,1)  <i>Thema der Bachelorarbeit:</i> Broadband Coherent anti-Stokes Raman Scattering Spectroscopy
8/1999 - 6/2008 Abschluss:	Musterschule Frankfurt Allgemeine Hochschulreife (Abschlussnote: 1,1)

---

**AUSZEICHNUNGEN UND STIPENDIEN**

---

13.06.2008	Abiturientenpreis der Gesellschaft Deutscher Chemiker
11/2014 – 10/2016	Doktorandenstipendium des Fonds der Chemischen Industrie

---

**ERSTVERÖFFENTLICHUNGEN**

---

A. Rodrigues-Correia, P. Seyfried, A. Heckel **2014**. *Wavelength-selective uncaging of oligonucleotides* (Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.)

P. Seyfried, L. Eiden, N. Grebenovsky, G. Mayer, A. Heckel, *Photo-Tethers for the (Multi-)Cyclic, Conformational Caging of Long Oligonucleotides*. Angew. Chem. **2017**, 1, 365-369